



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **AGENTES DE PREVENÇÃO CONTRA BIOFILMES DENTÁRIOS**

Trabalho submetido por  
**António Miguel Zurzica Tanganho**  
para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Carla Ascenso**

**novembro de 2015**



Aos meus pais

Ao meu irmão

Aos meus avós



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a toda a minha família especialmente aos meus pais, ao meu irmão e aos meus avós por me terem apoiado durante este percurso da minha vida, sem vocês seria impossível.

Obrigado Pai, Obrigado Mãe que em troca de nada me deram tudo. Obrigado Cláudio pelos conselhos, motivação e futuro neste curso.

Obrigado à Rita por cinco anos de paciência ao meu lado.

Obrigado a todos os meus amigos Alexandre Lampreia, Diogo Dias, João Moedas, João Silva, Mickael Santos e Pedro Coelho, às minhas amigas e à minha turma por estes anos inesquecíveis.

Obrigado a todas as outras pessoas que de uma maneira ou de outra contribuíram para o meu percurso académico.

Obrigado à AE-ISCSEM e à CDF por terem sido a minha segunda família e me terem ajudado a crescer como pessoa.

Obrigado à Prof. Doutora Carla Ascenso pelo seu apoio na realização desta monografia e durante o programa ERASMUS.

Obrigado a todos os professores que contribuíram para a minha formação ao longo de toda a minha vida de estudante.

Obrigado Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.

Muito Obrigado.



## RESUMO

A microflora oral residente é constituída por uma enorme diversidade de microorganismos. As bactérias tendem a agregar nas superfícies dentárias formando biofilmes. O crescimento de bactérias em biofilmes permite um aumento da tolerância contra agentes antimicrobianos utilizados em dentífricos e colutórios. A superfície dentária externa é constituída por esmalte e o seu principal constituinte é a hidroxiapatite (HAP). O esmalte encontra-se constantemente em processo de desmineralização e remineralização devido ao ambiente presente na cavidade oral. As bactérias como o *S.mutans*, também designadas por bactérias de ácido láctico, apresentam um metabolismo capaz de produzir ácido láctico através da fermentação dos hidratos de carbono adquiridos na alimentação. A libertação de ácido para a cavidade oral promove a diminuição do pH do meio resultando no favorecimento da dissolução total ou parcial dos cristais de HAP, ou seja, no favorecimento da desmineralização dentária. A saliva apresenta diversas funções na cavidade oral devido aos componentes salivares, uma das suas funções é o seu efeito tampão, que se deve principalmente à dos iões bicarbonato e fosfato e à capacidade destes neutralizarem os ácidos produzidos pelas bactérias. Estirpes bacterianas como *S.mutans* e *Lactobacillus* são responsáveis pelo aparecimento de doenças da cavidade oral como as cáries dentárias e as periodontites. No sentido de prevenir estas doenças existem agentes mecânicos, como a escova dentária e o fio dentário, e agentes químicos como a cloro-hexidina, triclosan, óleos essenciais, flúor e o cloreto de cetilpiridínio, que demonstram elevada eficácia e segurança na remoção dos biofilmes orais. Esta revisão consiste num conhecimento químico e terapêutico na prevenção dos biofilmes dentários com o fim de reforçar o aconselhamento de um farmacêutico na saúde oral.

**Palavras-chave:** agente de prevenção, biofilme, cárie dentária, cloro-hexidina, saliva.

## ABSTRACT

The resident oral microflora consists of a huge diversity of microorganisms. Bacteria tend to aggregate in tooth surfaces forming biofilms. The growth of bacteria in biofilms allows increased tolerance against antimicrobial agents, those are used in dentifrices and mouthwashes. The outer dental surface is formed by enamel and its principal component is hydroxyapatite (HAP). The enamel is constantly in the process of demineralization and remineralization due to the environment present in the oral cavity. The bacteria such as *S. mutans*, also referred to as lactic acid bacteria present capable of producing lactic acid by fermentation over metabolism of carbohydrates in the diet. The release of acid to the oral cavity promotes the decrease of pH resulting in facilitating the total or partial dissolution of HAP crystals, or in furtherance of dental demineralization. Saliva has several functions in the oral cavity due to salivary components, one of its functions is buffering effect, which is mainly due to the bicarbonate and phosphate ions and to their ability to neutralize the acids produced by bacteria. Bacterial strains as *S. mutans* and *Lactobacillus* are responsible for oral diseases such as tooth caries and periodontitis. In order to prevent these diseases there are mechanical agents, such as tooth brushing and flossing, and chemical agents such as chlorhexidine, triclosan, essential oils, fluoride and cetylpyridinium chloride which show high efficacy and safety in the removal of biofilms oral. This review is a chemical and therapeutic knowledge for the prevention of dental biofilms in order to strengthen the advice of a pharmacist in oral health.

**Keywords:** prevention agents, biofilm, dental caries, chlorhexidine, saliva



## **ÍNDICE GERAL**

DEDICATÓRIA .....	3
AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
ÍNDICE GERAL .....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ÍNDICE DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	13
INTRODUÇÃO .....	15
DESENVOLVIMENTO .....	17
BIOFILMES DENTÁRIOS - PLACA BACTERIANA.....	17
ESMALTE DENTÁRIO: AÇÃO BACTERIANA NA DESMINERALIZAÇÃO .....	23
SALIVA: AÇÃO NA REMINERALIZAÇÃO.....	26
INFEÇÕES DA CAVIDADE ORAL.....	28
AGENTES DE PREVENÇÃO CONTRA BIOFILMES DENTÁRIOS.....	31
Controlo mecânico .....	31
Controlo químico .....	33
Segurança dos agentes antimicrobianos orais.....	43
Produtos comercializados .....	43
CONCLUSÃO.....	47
BIBLIOGRAFIA .....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Interações da bactéria-hospedeiro. As adesinas presentes na bactéria ligam-se especificamente aos recetores da superfície dentária (Hannig et al., 2010) .....	17
<b>Figura 2.</b> Fases da formação do biofilme na superfície dentária. A-formação da película; B-adesão inicial; C-maturação; D-dispersão (Huang, R. et al., 2011) .....	19
<b>Figura 3.</b> Interações bacterianas (Huang, R. et al., 2011) .....	20
<b>Figura 4.</b> Fatores influentes na composição, atividade e estabilidade microbiana do biofilme. Adaptado de (Marsh & Devine, 2011) .....	22
<b>Figura 5.</b> Reação química da formação da HAP. A pH igual a 6,2 o íon fosfato altera a sua forma iónica. Acima de pH 7,0 a apatite inicial $\text{CaHPO}_4$ (amorfo) sofre reações espontâneas formando os cristais de HAP $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Levine, 2011) .....	24
<b>Figura 6.</b> Formação do ácido láctico a partir de sacarose (Levine, 2011) .....	25
<b>Figura 7.</b> Desmineralização dos cristais de HAP. Após a diminuição do pH, os prótons promovem a dissolução dos cristais do esmalte e a consequente libertação dos iões $\text{Ca}^{2+}$ e $\text{HPO}_4^{2-}$ (Hannig et al., 2010) .....	26
<b>Figura 8.</b> Reações químicas associadas ao consumo de ácido láctico pelo íon bicarbonato, presente na saliva estimulada. Adaptado de (Levine, 2011) .....	27
<b>Figura 9.</b> Metabolismo das bactérias produtoras de ácido láctico e consequente desmineralização (Hannig et al., 2010) .....	29
<b>Figura 10.</b> Desmineralização na presença do íon flúor no biofilme após refeição rica em açúcares (Cury et al., 2009) .....	30
<b>Figura 11.</b> Desmineralização na presença do íon flúor no biofilme finda a exposição aos açúcares e após neutralização do ácido pela saliva (Cury et al., 2009) .....	30
<b>Figura 12.</b> Gráfico da relação entre a concentração do antimicrobiano em função do tempo. A concentração do agente deve estar sempre acima da CMI e CMB (Marsh, 2010) .....	34
<b>Figura 13.</b> Estrutura da CHX .....	35
<b>Figura 14.</b> Mecanismo de Ação da CHX (Balagopal et al., 2013) .....	36
<b>Figura 15.</b> Estrutura do TCS .....	37

<b>Figura 16.</b> Exemplos de fluorose (Carey, 2014).....	40
<b>Figura 17.</b> Estrutura do CPC (Marotta-Oliveira et al., 2011).....	41
<b>Figura 18.</b> Solução bucal Bexident® de 0,12% de gluconato de clorohexidina (Isdin, 2015) .....	44
<b>Figura 19.</b> Colutório Bexident® formulado com triclosan e NaF.....	45
<b>Figura 20.</b> Elixir Listerine® <i>Total Care</i> (Johnson & Johnson, 2014).....	46
<b>Figura 21.</b> Elixir Periogard Plus® de cloreto de cetilpiridínio a 0,05% (Colgate- Palmolivecompany, 2015).....	46

## **ÍNDICE DE TABELAS**

**Tabela 1.** Propriedades dos biofilmes (Adaptado de (Marsh, Moter, et al., 2011))..... 18

**Tabela 2.** Componentes salivares e suas ações nos biofilmes dentários. Adaptado de (Garcia-Godoy et al., 2008)..... 27

**Tabela 3.** Classes e exemplos de inibidores utilizados como agentes químicos antimicrobianos em colutórios e dentífricos. Adaptado de (Marsh, 2010)..... 34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADA - American Dental Association

AHL - N-acil homoserina lactonas

AI - Autoinducer

Ca<sup>2+</sup> - Ião cálcio

CHX - Cloro-hexidina

CMB - Concentração mínima bactericida

CMI - Concentração mínima inibitória

CPC - Cloreto de cetilpiridínio

F<sup>-</sup> - Ião fluoreto

FAP - Hidroxiapatite fluoretada

FDA - *Food and Drug Administration*

H<sup>+</sup> - Protão (usado por facilidade de escrita, em detrimento do Ião hidrônio, H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>)

HAP - Hidroxiapatite

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

K<sup>+</sup> - Ião potássio

LAB - Ácido láctico bacteriano

min - Minutos

mL - Mililitro

MUC - Mucinas

PCR - *Polymerase chain reaction*

ppm - Partes por milhão

PRP - Proteínas ricas em prolina

PTS - Sistema da fosfotransferase

QS - *Quorum sensing*

s - Segundos

Sn<sup>2+</sup> - Ião estanho

TCS - Triclosan

TNF - Fator de necrose tumoral

Zn<sup>2+</sup> - Ião zinco

*Fórmulas Químicas:*

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$  - Cristal de hidroxiapatite fluoretada (ou fluorapatite)

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  - Cristal de hidroxiapatite

$\text{CO}_2$  - Dióxido de carbono

$\text{HCO}_3^-$  - Ião bicarbonato

$\text{H}_2\text{CO}_3$  - Ácido carbónico

$\text{H}_2\text{O}$  - Água

$\text{HPO}_4^{2-}$  - Ião hidrogenofostato

$\text{H}_2\text{PO}_4^-$  - Ião di-hidrogenofostato

$\text{NaF}$  - Fluoreto de sódio

$\text{PO}_4^{3-}$  - Ião fosfato

## **INTRODUÇÃO**

A necessidade de utilizar agentes de prevenção em biofilmes dentários constitui uma importante área de estudo, uma vez que os biofilmes orais são responsáveis por diversas infecções na cavidade oral como periodontites, gengivites e cáries dentárias (Zijnga et al., 2010).

Inicialmente, os investigadores focaram-se no desempenho bacteriano de uma única espécie em meios líquidos de cultura. O crescimento destas estirpes de bactérias é designado de crescimento planctónico. Posteriormente os investigadores perceberam que a maioria, se não todas, as bactérias vivem em biofilmes em vez de meios líquidos (Huang, R. et al., 2011). Neste sentido, a investigação em biofilmes captou a atenção dos investigadores, e esta área de pesquisa tornou-se popular nos últimos anos (Huang, R. et al., 2011).

Um conhecimento sobre a natureza e a fisiologia dos biofilmes dentários é importante para implementar estratégias de gestão adequadas para a prevenção do desenvolvimento das mesmas. Estes biofilmes não podem ser definitivamente eliminados, mas sim reduzidos e controlados mediante cuidados de higiene oral diários. Um regime diário de procedimentos higiénicos mecânicos orais, que incluem a escovagem e a utilização de fio dentário, é a chave para o controlo de biofilmes. Uma vez que os dentes apenas representam 20% da cavidade oral, de forma a otimizar a higiene oral, o uso de agentes microbianos, constitui um complemento no controlo não alcançado pela escovagem e pelo fio dentário, assim como nos biofilmes presentes nos reservatórios da mucosa oral (Gurenlian, 2007).

A superfície dentária externa é constituída pelo tecido mineralizado mais resistente presente no organismo humano, denominado esmalte. O esmalte encontra-se em constantes processos de desmineralização e remineralização, sendo o seu mineral constituinte a hidroxiapatite, HAP (Jayasudha et al., 2014). Pelo facto do esmalte ser a parte mais externa do dente, encontra-se em contacto direto total com o ambiente da cavidade oral e com as bactérias presentes no mesmo, as quais tendem a associar-se em colónias à superfície do dente, formando o que se designa de biofilme (Marsh, 2010). Após uma refeição, as bactérias presentes nos biofilmes fermentam a sacarose ingerida na alimentação, produzindo ácido láctico que diminui o pH do meio e promove a dissolução de iões presentes no esmalte, favorecendo a cárie dentária (Garcia-Godoy et al., 2008).

A saliva está envolvida em diversas funções, como a lubrificação oral, a formação do bolo alimentar e também a proteção contra as cáries dentárias. Para além de conter componentes com papel na prevenção da cárie dentária, como algumas enzimas que protegem a dissolução do esmalte, uma das principais funções protetoras da saliva é devida à sua capacidade tampão, ao facto de conter espécies químicas suscetíveis de serem protonadas (bases), que neutralizam os ácidos formados pelas bactérias, repondo o pH do meio e promovendo a remineralização (Lenander-Lumikari et al., 2000).

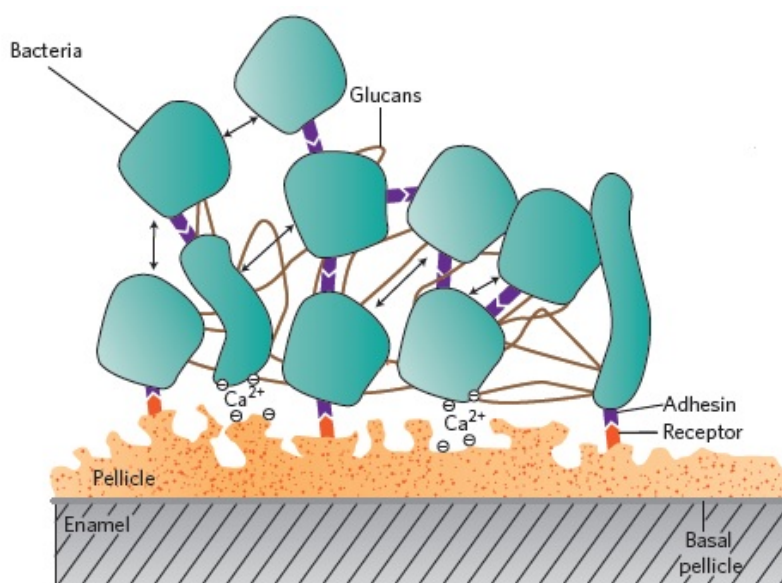
São diversos os produtos antimicrobianos químicos e mecânicos com o fim terapêutico na prevenção destes biofilmes dentários, fármacos como a cloro-hexidina, o triclosan e o cloreto de cetilpiridínio estão envolvidos neste processo de prevenção, como mostra o capítulo 2. Como futuro profissional de saúde, revela-se essencial o conhecimento dos mecanismos de ação destes fármacos, nomeadamente para a aplicação de conhecimentos ao nível do aconselhamento (higiene, diferenças entre produtos comerciais com vista a sugestão do produto mais adequado). O objetivo deste trabalho é, portanto, o levantamento dos agentes de prevenção de biofilmes dentários comercializados e seus mecanismos de atuação. De forma a enquadrar o problema, far-se-á primeiramente uma revisão sobre a formação dos biofilmes, sobre o seu efeito no esmalte dentário, sobre a ação da saliva, bem como sobre as infeções na cavidade oral associadas à presença de biofilmes dentários.



## DESENVOLVIMENTO

### BIOFILMES DENTÁRIOS - PLACA BACTERIANA

A microflora oral residente é constituída por uma enorme diversidade de microorganismos. Os principais constituintes desta microflora são as bactérias. Estudos recentes, recorrendo à técnica de PCR (do inglês *polymerase chain reaction*, reacção em cadeia da polimerase), indicam que existam cerca de 700 estirpes bacterianas presentes na cavidade oral (Baehni et al., 2003; Marsh & Devine, 2011). De facto, os biofilmes são compostos por microcolónias de células bacterianas (correspondendo a 15-20% do volume do biofilme), que se distribuem num modo não aleatório, contidos numa estrutura tridimensional formada por uma matriz de polissacarídeos (correspondente a 75-80% volume do biofilme) ligados a uma superfície sólida como o esmalte dos dentes ou a superfície dos implantes de raiz dentária (Socransky et al., 2002; Zijng et al., 2010). O desenvolvimento destes biofilmes orais depende de interações entre adesinas presentes na superfície celular das bactérias e receptores do hospedeiro (Fig. 1). As interações que ocorrem entre as bactérias promovem a colonização e tornam a comunidade microbiana mais complexa, que em muitos casos, consiste em 50 ou mais espécies bacterianas diferentes presentes numa única localização (Jakubovics et al., 2010).



**Figura 1.** Interações da bactéria-hospedeiro. As adesinas presentes na bactéria ligam-se especificamente aos recetores da superfície dentária (Hannig et al., 2010)

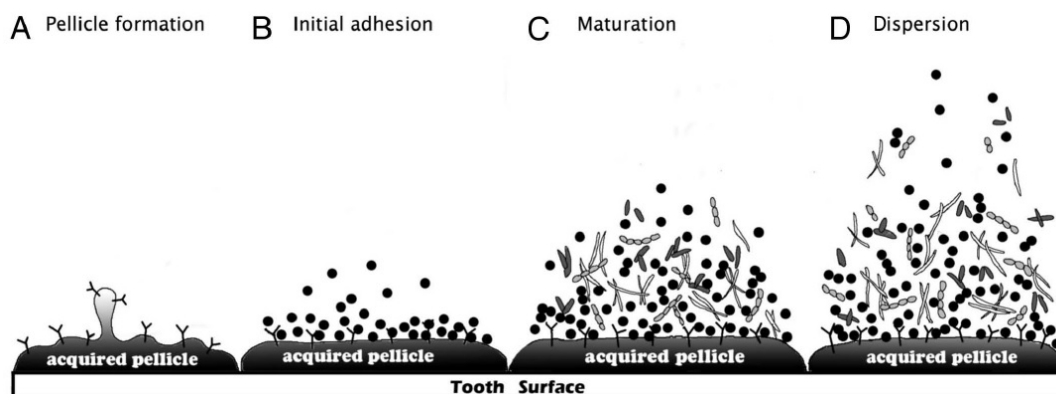
As interações químicas que ocorrem entre as bactérias nos biofilmes são críticas para a sua estabilidade, quer as interações entre bactérias da mesma estirpe, quer entre bactérias de estirpes diferentes, e estão diretamente relacionadas com a maturação dos biofilmes. Igualmente importantes na estabilidade dos biofilmes são as interações entre as bactérias e o hospedeiro (Jakubovics et al., 2010). A tabela 1 mostra as propriedades dos biofilmes que contribuem para a sua estabilidade.

**Tabela 1.** Propriedades dos biofilmes (Adaptado de (Marsh, Moter, et al., 2011))

Propriedades	Exemplos
Arquitetura Livre	Presença de canais e lacunas
Proteção microbiana	Produção de polímeros extracelulares que formam a matriz funcional; Proteção física contra fagocitoses
Proteção do hospedeiro	Colonização; Resistência
Tolerância reforçada aos antimicrobianos	Sensibilidade reduzida à cloro-hexidina e aos antibióticos; Transferência de genes
Neutralização de inibidores	Produção de $\beta$ -lactamases através das células vizinhas para proteção da parede celular
Nova expressão de genes	Síntese de novas proteínas em anexo ou na ligação com as moléculas do hospedeiro
Respostas genéticas coordenadas	Produção de moléculas de sinalização bacteriana (Ex: CSP, AI-2)
Comunicação com o hospedeiro	Regulação da resposta pró-inflamatória, através das bactérias residentes na cavidade oral; Remodelação do citoesqueleto das células epiteliais
Heterogeneidade espacial e ambiental	pH e gradientes de O <sub>2</sub> ; Co-adesão
Habitat amplo	Anaeróbios num ambiente aeróbio
Metabolismo mais eficiente	Catabolismo completo das macromoléculas complexas do hospedeiro
Virulência reforçada	Sinergismo patogénico nas doenças periodontais

O crescimento e o desenvolvimento do biofilmes são caracterizados por 4 fases, como ilustrado na figura 2: formação da película adquirida, fase de adesão inicial, fase de maturação e fase de dispersão (Huang, R. et al., 2011).

A primeira fase de formação de um biofilme (Fig. 2A) é constituída pelo aparecimento da película adquirida, que consiste na deposição de glicoproteínas salivares (como a estaterina e as mucinas MUC5B e MUC7B) nas superfícies dos dentes. Esta película torna a superfície dentária recetiva à colonização de bactérias. Normalmente os primeiros microorganismos a colonizar o dente são os *coccus* gram-positivo como *S. mutans* ou *S. sanguinis*. Para o desenvolvimento do biofilme contribuem várias interações



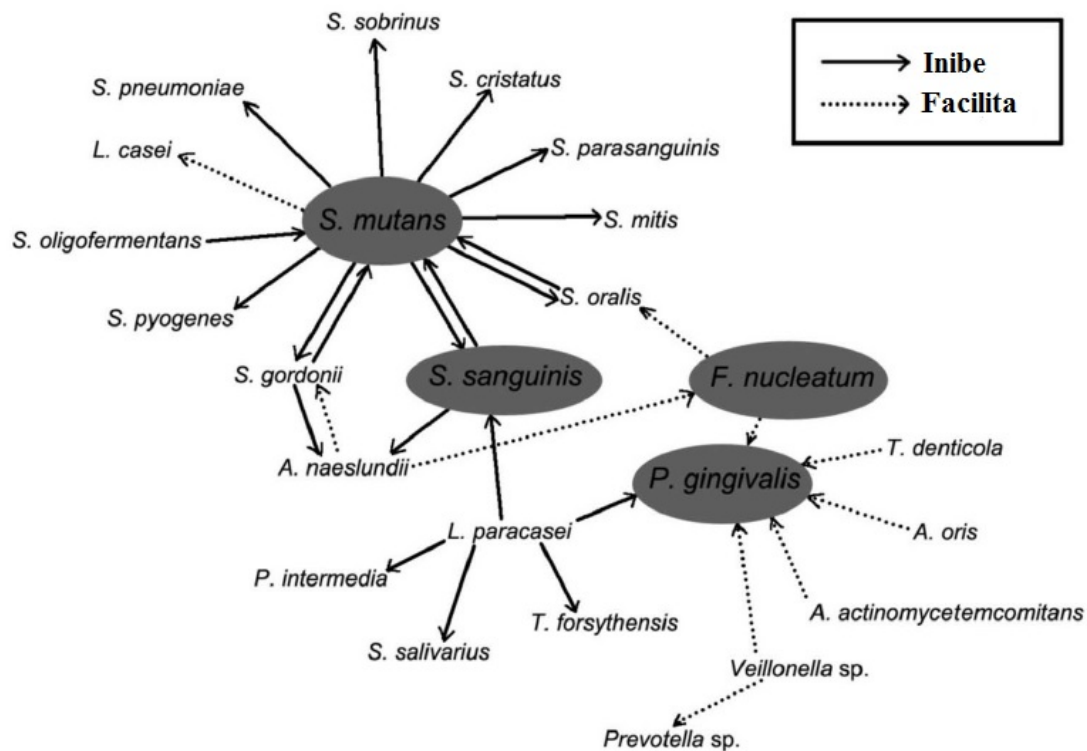
**Figura 2.** Fases da formação do biofilme na superfície dentária. A-formação da película; B-adesão inicial; C-maturação; D-dispersão (Huang, R. et al., 2011)

entre glicoproteínas salivares, outros componentes presentes na saliva e a superfície dentária (Gurenlian, 2007; Huang, R. et al., 2011).

Posteriormente ocorre a fase de adesão bacteriana sobre a película adquirida já formada (Fig. 2B). As bactérias reconhecem proteínas de ligação na película (como a  $\alpha$ -amilase) e estabelecem ligações fundamentalmente eletrostáticas, para além de outros arranjos físicos, ligações essas que por não serem muito fortes conferem reversibilidade ao processo (é relativamente fácil a sua reversão). Após a ligação da bactéria pioneira à película, inicia-se a secreção de substâncias poliméricas extracelulares que fortalecem a adesão através de interações químicas como pontes de hidrogénio, interações hidrofóbicas, pontes de cálcio, forças de Van der Waals e eletrostáticas. Estirpes como *Actinomyces* spp, *Streptococcus* spp, *Haemophilus* spp, *Capnocytophaga* spp, *Veillonella* spp e *Neisseria* são as primeiras a estabelecerem estas ligações e a adquirir espaço na superfície dos dentes em relação às outras bactérias (Huang, R. et al., 2011; Marsh & Devine, 2011).

Na fase de maturação (Fig. 2C) as bactérias libertam quantidades de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água e forma-se a matriz. Esta matriz é fundamental na manutenção da estrutura e no funcionamento do biofilme, uma vez que consegue reter água, nutrientes, enzimas e impedir a penetração de alguns agentes químicos antissépticos e/ou desinfetantes, como por exemplo a cloro-hexidina. As colónias secundárias aderem aos recetores presentes na bactéria que estabeleceu ligação inicialmente, aumentando a diversidade microbiológica do biofilme. Este processo é fundamental nas interações bacterianas e é denominado de coagregação ou de coadesão. É importante realçar que a agregação das bactérias é específica e não acontece aleatoriamente, dependendo do reconhecimento ao nível dos polissacarídeos à superfície das células bacterianas

(Gurenlian, 2007; Huang, R. et al., 2011; Marsh, Moter, et al., 2011). Na figura 3 encontra-se esquematizada a relação de reconhecimento entre as várias estirpes bacterianas presentes nos biofilmes.



**Figura 3.** Interações bacterianas (Huang, R. et al., 2011)

A última fase do processo de formação dos biofilmes (Fig. 2D) é referente à dispersão bacteriana, de uma única célula ou de um aglomerado de células, por erosão e/ou escamação. Este fenómeno de dispersão bacteriana pode resultar quer da necessidade de busca de nutrientes pelos microorganismos, como resposta à diminuição da velocidade de crescimento sentida em colónias de dimensões elevadas (fase de saturação do crescimento bacteriano), quer da ação defensiva do hospedeiro, com a produção do fluido salivar que dificulta o desenvolvimento do biofilme (Huang, R. et al., 2011; Xavier et al., 2003).

Como já foi referido, algumas das funções dos biofilmes estão relacionadas diretamente com a capacidade de comunicação e sinalização bacteriana, intra e interespecíes. Esta comunicação é de tal forma eficaz que permite um funcionamento tipo organismo multicelular, facto que apresenta diversas vantagens para o biofilme, nomeadamente na adaptação às alterações do ambiente, na defesa contra competidores e

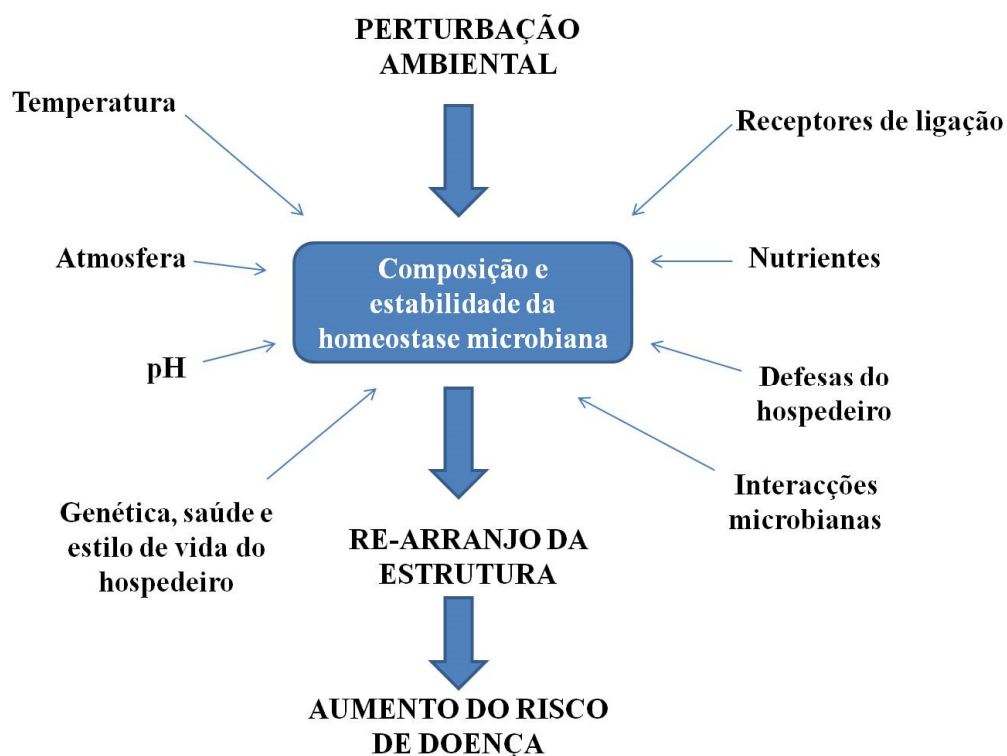
na resistência antibiótica. Este sistema de comunicação é designado por *quorum sensing* (QS) e o seu conhecimento (o conhecimento das moléculas sinalizadoras envolvidas, dos respetivos recetores membranares ou citoplasmáticos e do efeito resultante da sua interação) poderá permitir o controlo das infeções bacterianas (Huang, R. et al., 2011; Li, Y. H. et al., 2012).

Em 2005, Qi e os seus colaboradores (Kreth et al., 2005) demonstraram que biofilmes de bactérias com *S. mutans*, *S. gordonii*, *S. mitis* e *S. sanguinis* são controlados por um sistema QS que regula a expressão genética do biofilme. O sistema QS está envolvido em diversos processos como a coordenação do biofilme, resistência antibiótica e aumento da patogenicidade. Várias e diferentes moléculas podem ser utilizadas como sinal, sendo as mais comuns os oligopéptidos nas bactérias gram-positivo, as N-acil-homoserina lactonas (AHL) em bactérias gram-negativo e as moléculas sinalizadoras denominadas como *autoinducer-2* (AI-2) em bactérias gram-negativo e gram-positivo (Li, Y. H. et al., 2012). As bactérias que utilizam o sistema QS produzem e secretam as moléculas sinalizadoras, assim como apresentam um recetor capaz de detetar especificamente esse indutor (são autoindutoras). Quando ocorre a ligação indutor-recetor, a bactéria ativa a transcrição de determinados genes, mas para que a transcrição de genes seja ativa, a célula bacteriana deve encontrar moléculas sinalizadas por diferentes bactérias. Quando apenas algumas bactérias do mesmo tipo se encontram nas proximidades, a concentração de indutores no meio é diminuída para cerca de zero. No entanto, à medida que a diversidade bacteriana no biofilme cresce, as concentrações de indutores aumentam (maior produção da parte das células) formando-se um ciclo de *feedback* positivo, uma vez que os recetores acabam por estar sempre ativos. Isto induz um aumento na regulação genética que permite o comportamento coordenado em diversas situações (Li, Y. H. et al., 2012). Não obstante, as interações podem variar de sinérgicas para antagónicas, quando a produção de metabolitos com atividade antimicrobiana ou a competição por nutrientes entre as bactérias inibem o crescimento dos colonizadores (Demuyser et al., 2014).

Uma vez formada, a placa bacteriana é caracterizada por o seu nível de estabilidade perante diversos fatores ambientais, tais como a alimentação, as defesas do hospedeiro, a higiene oral e algumas alterações do fluxo salivar. Esta estabilidade é conhecida por homeostase microbiana, mas em qualquer ecossistema esta estabilidade pode ser quebrada e um desses exemplos poderá ser a presença de doenças na cavidade oral. Os indivíduos que ingerem quantidades substanciais de açúcar apresentam maior número de

bactérias (como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp.) responsáveis por doenças periodontais (Marsh, 2006). A figura 5 mostra alguns dos principais factores que contribuem para a alteração da estabilidade microbiana.

O crescimento de bactérias em biofilmes, como a placa bacteriana, permite um aumento da tolerância contra agentes antimicrobianos utilizados em dentífricos e em colutórios. A concentração necessária de cloro-hexidina e de fluoreto de amina para eliminar o crescimento num biofilme estabilizado, de bactérias como o *S. sobrinus* é, respetivamente, 300 e 75 vezes superior à concentração mínima bactericida contra as células planctónicas (Shani et al., 2000). M. Wilson (Millward et al., 1988) e mais tarde K. Okuda (Takahashi et al., 2007) mostraram que a idade dos biofilmes é igualmente um fator importante na tolerância a agentes antibacterianos, na medida em que biofilmes contendo *S. sanguinis* ou *A. Actinomycetemcomitans* revelaram um aumento da resistência à cloro-hexidina e à ação antibiótica, respetivamente, com o aumento da idade dos mesmos. Contudo, a sensibilidade revelou-se ser dependente do organismo, bem como do mecanismo de atuação do antibiótico utilizado (Marsh, Moter, et al., 2011).



**Figura 4.** Fatores influentes na composição, atividade e estabilidade microbiana do biofilme. Adaptado de (Marsh & Devine, 2011)

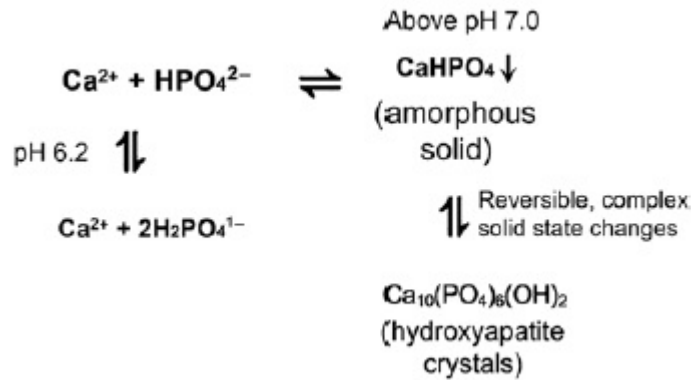
## ESMALTE DENTÁRIO: AÇÃO BACTERIANA NA DESMINERALIZAÇÃO

A superfície dentária é constituída por esmalte. No contexto desta revisão é importante ter uma noção geral da sua constituição, bem como nos fenómenos de desmineralização e remineralização a que está sujeito devido à elevada e constante exposição à placa bacteriana.

O esmalte dentário é constituído por um mineral denominado por hidroxiapatite (HAP), que representa a forma cristalizada do fosfato de cálcio (96%), e os 4% restantes são constituídos por água e compostos orgânicos (Jayasudha et al., 2014). A matéria orgânica contém uma rede de microporos localizada entre os cristais de HAP, a qual contém água suficiente para permitir a entrada de ácidos e outros componentes para o interior do dente e a saída de produtos da desmineralização para o exterior (Featherstone et al., 2006). O sistema de microporos forma uma ligação dinâmica entre o meio oral e o esmalte, fazendo do esmalte um tecido semipermeável. Desta forma, os processos de desmineralização e remineralização, assim como os processos de ação tóxica de produtos remineralizantes, não ocorrem simplesmente ao nível da superfície de esmalte, mas sim em profundidade através do sistema de microporos. Com o avanço da idade, a permeabilidade do esmalte diminui, assim como o volume dos poros, a solubilidade aos ácidos e o conteúdo de água (Hilton et al., 2013). O ião cálcio é sempre um catião divalente ( $\text{Ca}^{2+}$ ), enquanto o ião fosfato pode apresentar diversas formas iónicas que dependem do pH.

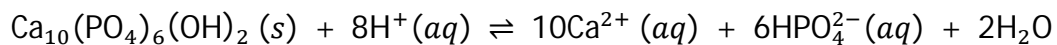
A apatite forma-se por precipitação de hidrogenofosfato de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) em condições alcalinas ( $\text{pH} > 7$ ) (Fig. 5). Em fase inicial de formação, a apatite é frágil e quebradiça, apresentando uma estrutura amorfa e não cristalina. Nesta fase a apatite sofre processos espontâneos que envolvem a desprotonação de iões  $\text{HPO}_4^{2-}$  e a incorporação de iões  $\text{OH}^-$ , provenientes da auto-ionização da água presente no precipitado. Estas reações químicas são acompanhadas de rearranjos estruturais, sendo o resultado final a HAP com a fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . A HAP é um cristal fino, duro e plano responsável pela resistência dos ossos e dentes (Levine, 2011).

O esmalte encontra-se constantemente em processo de desmineralização e de remineralização devido ao ambiente presente na cavidade oral. Se por um lado o ambiente na cavidade oral promove a estabilidade do esmalte, por outro permite que o esmalte dentário seja vulnerável à sua destruição, ou seja, que a desmineralização acabe por ganhar vantagem relativamente à remineralização. O principal fator da dissolução da



**Figura 5.** Reação química da formação da HAP. A pH igual a 6,2 o íon fosfato altera a sua forma iônica. Acima de pH 7,0 a apatite inicial  $\text{CaHPO}_4$  (amorfo) sofre reações espontâneas formando os cristais de HAP  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (Levine, 2011)

HAP é a sua solubilidade, que é dependente do pH do meio (Roveri et al., 2009). A taxa de dissolução da HAP aumenta com a diminuição do pH, sendo também influenciada pelas concentrações de íons cálcio, fosfato e hidroxilo presentes em solução, como mostra a seguinte equação:



O grau de saturação da HAP corresponde à razão entre o produto da atividade dos íons para a HAP e a constante de solubilidade da HAP ( $K_{\text{HAP}}$ ) de acordo com a equação.

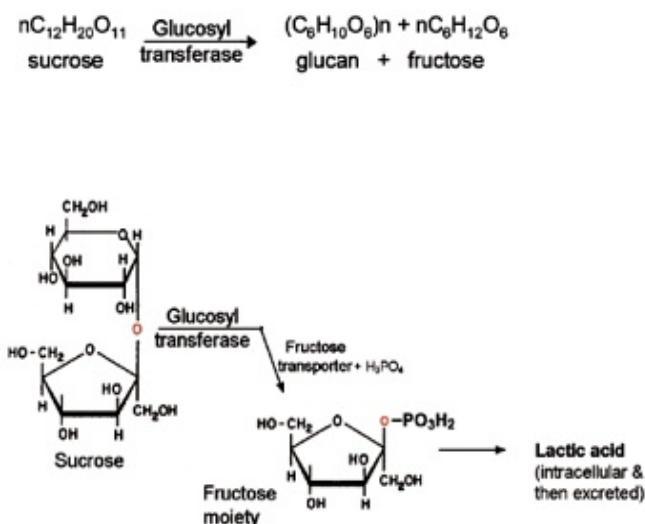
$$\text{Grau de saturação HAP} = \left[ \frac{(\text{Ca}^{2+})^5 (\text{OH}^-) (\text{PO}_4^{3-})^3}{K_{\text{HAP}}} \right]^{1/9}$$

Quando o grau de saturação é inferior a 1, a solução encontra-se insaturada em relação à HAP e portanto é promovida a dissolução dos cristais. Valores superiores a 1 são indicativos da supersaturação do meio em relação à HAP, conduzindo à precipitação de fosfato e cálcio. Assim, à medida que o pH diminui, as concentrações de fosfato e hidroxilo também diminuem, ajudando a redução do grau de saturação (West et al., 2014).

A desmineralização é um processo físico-químico que é promovido pelo metabolismo bacteriano. As bactérias como o *S. mutans*, também conhecidas por bactérias do ácido láctico (LAB), apresentam um metabolismo com capacidade de produzir ácido láctico a partir de hidratos de carbono provenientes da alimentação. Estas bactérias contêm enzimas como a glucosiltransferase (GTF), que sintetizam frutose a partir

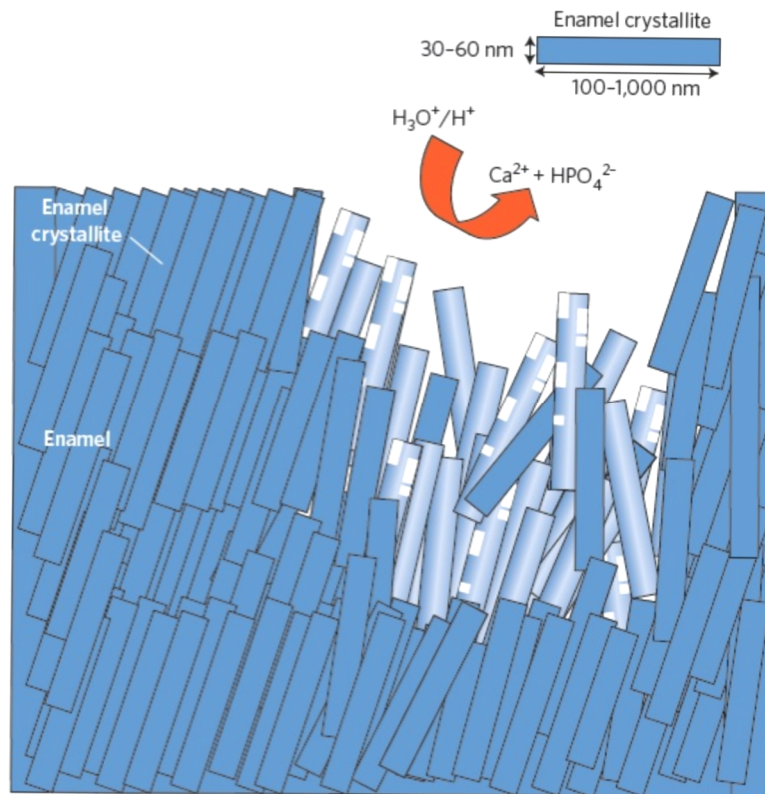


da sacarose ingerida. A frutose produzida adere ao sistema enzimático glicanfosfotransferase (PTS) à superfície da célula, é fosforilada pelo fosfoenolpiruvato a frutose 6-fosfato e nesta forma é transportada para o citoplasma, onde entra na via glicolítica para ser convertida em ácido láctico (Fig. 6) (Levine, 2011).



**Figura 6.** Formação do ácido láctico a partir de sacarose (Levine, 2011)

A fermentação dos hidratos de carbonos pelas bactérias presentes nos biofilmes dentários promovem a libertação de ácido para a cavidade oral, o que resulta numa diminuição do pH do meio e, conseqüentemente, no favorecimento da dissolução total ou parcial dos cristais de HAP. Atrás (Fig. 5, equações e texto) discutiu-se a dependência do pH da reação química de formação da HAP, na figura 7 pretende-se mostrar um esquema do efeito da dissolução da HAP em meio ácido, a qual corresponde à desmineralização do esmalte. Este processo é revertido naturalmente, quando diminui a concentração de açúcares e há reposição dos valores fisiológicos de pH pela saliva. Uma vez que existem concentrações sobressaturadas de iões cálcio e iões fosfato na saliva, estes iões estão em constante deposição na superfície dentária, permitindo um processo adjuvante na remineralização dentária. Adicionalmente, os biofilmes também contêm estes mineirais que se dissociam no esmalte dentário após a sua desintegração após a escovagem. A remineralização é definida como a reposição dos minerais perdidos após a estabilização dos níveis de pH (Cury et al., 2009).



**Figura 7.** Desmineralização dos cristais de HAP. Após a diminuição do pH, os prótons promovem a dissolução dos cristais do esmalte e a consequente liberação dos íons  $Ca^{2+}$  e  $HPO_4^{2-}$  (Hannig et al., 2010)

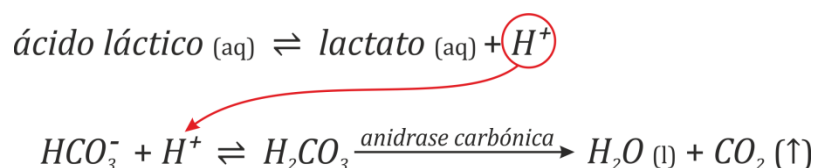
## SALIVA: AÇÃO NA REMINERALIZAÇÃO

A saliva é um suco aquoso e viscoso, secretado na cavidade oral por pares de glândulas *major* (parótidas, submandibulares, sublinguais) e diversas glândulas *minor* (espalhadas por todo o epitélio oral). Para além de água, a saliva é constituída por matéria orgânica (aminoácidos, proteínas entre as quais enzimas e imunoglobulinas, células epiteliares da mucosa oral) e por matéria inorgânica (cálcio, fluor, bicarbonato, fosfato, entre outros) (Huang, C. M., 2004; Lenander-Lumikari et al., 2000). A tabela 2 relaciona os principais componentes da saliva com as suas funções, incluindo as de proteção do esmalte dentário.

**Tabela 2.** Componentes salivares e suas ações nos biofilmes dentários. Adaptado de (Garcia-Godoy et al., 2008)

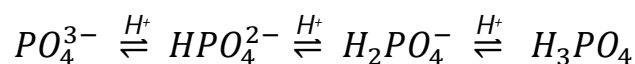
COMPONENTES SALIVARES	FUNÇÕES
PRP, estaterina, cálcio, fosfato, flúor, mucinas	Remineralização
Bicarbonato, fosfato, CO <sub>2</sub> , proteínas alcalinas, urease	Tampão de Acidez
Amilase, lipase, protease, DNase, RNase	Digestão
Mucinas, glicoproteínas	Lubrificação
Mucinas, lactoferrina, IgA, PRP, estaterina, lisozima	Agregação e clearance de microorganismos
Mucinas, lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, histatinas, cistatinas, aglutinina, PRP	Agentes antibacterianos
IgA, mucinas, histatinas	Agentes antivirais e antifúngicos
Mucinas	Formação do bolo alimentar
Mucinas, Zinco	Paladar, sabor

A saliva apresenta a capacidade de tamponizar o meio oral, mantendo o pH no intervalo 6,0-7,5. Este efeito tampão deve-se principalmente à presença de íons bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e íons fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e à sua capacidade de captar prótons, neutralizando o ácido produzido pelas bactérias (Aframian et al., 2006). O biofilme dentário contém, como referido anteriormente, bactérias como a *S. mutans* (ou LAB) que usam hidratos de carbono provenientes da dieta e produzem ácido láctico. O ácido láctico reage reversivelmente com o íon bicarbonato da saliva estimulada, convertendo-o em ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ). Se o  $\text{H}_2\text{CO}_3$  permanecesse na cavidade oral, a evolução dos equilíbrios ácido-base a montante dependia diretamente da concentração das espécies no meio e o fenómeno de neutralização do ácido tenderia a cessar. No entanto, quer o biofilme bacteriano, quer a saliva contêm vestígios de anidrase carbónica, uma enzima que converte  $\text{H}_2\text{CO}_3$  em água e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), sendo este último um gás que se liberta para o exterior quando a boca é aberta. Assim, o  $\text{H}_2\text{CO}_3$  é consumido numa reação com carácter irreversível, favorecendo a neutralização do ácido láctico (Fig. 8) (Bardow et al., 2000; Levine, 2011).



**Figura 8.** Reações químicas associadas ao consumo de ácido láctico pelo ião bicarbonato, presente na saliva estimulada. Adaptado de (Levine, 2011)

Os íões fosfato também estão envolvidos na neutralização do ácido resultante do metabolismo bacteriano, mas neste caso a sua ação é mais relevante na saliva não estimulada. Por ser um triprótico, o fosfato pode assumir quatro formas possíveis, que se mantêm em equilíbrio químico: a forma totalmente desprotonada ( $PO_4^{3-}$ ), a forma monoprotonada ( $HPO_4^{2-}$ ), a diprotonada ( $H_2PO_4^-$ ) e a totalmente protonada ( $H_3PO_4$ ). A valores de pH fisiológico, as formas mais abundantes são as mono e diprotonadas, ambas espécies anfipróticas, logo, com capacidade tampão (Bardow et al., 2000).

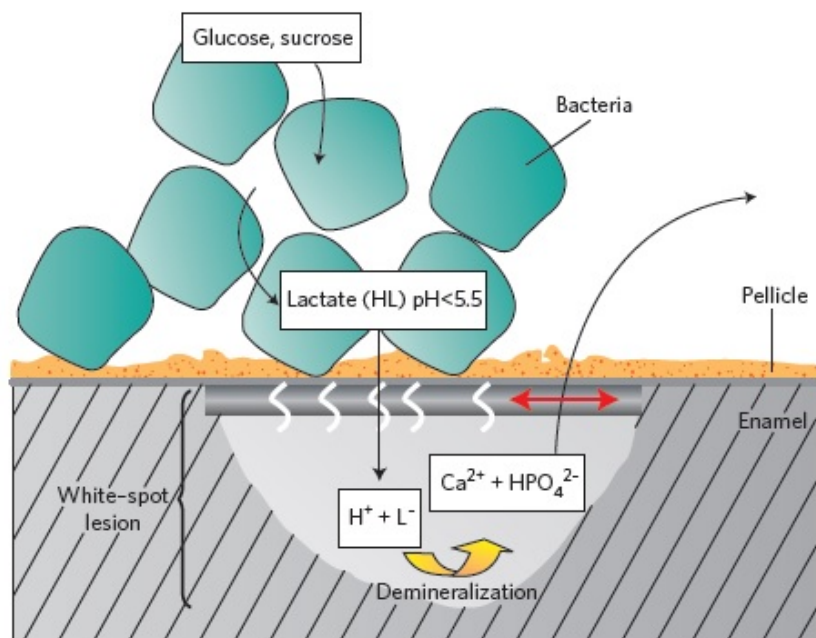


Apesar de alguns componentes salivares conferirem uma proteção antibacteriana na superfície do esmalte dentário, também possuem recetores que promovem a agregação bacteriana, como as PRP. Os microorganismos têm tendência a interagir com estas glicoproteínas por forças electrostáticas, iónicas hidrofóbicas e de Van der Waals (Garcia-Godoy et al., 2008). Vários estudos demonstram que proteínas como a aglutinina, estaterina, mucinas e Ig salivares promovem a adesão de *Streptococcus spp*, enquanto a estaterina contribui para a colonização precoce de *Actinomyces*. Assim sendo, revela-se crucial identificar as proteínas salivares que apresentam afinidade com componentes bacterianos, com o fim de controlar a patogenicidade microbiana e manter a imunidade da cavidade oral (Baik et al., 2013; Carlen et al., 2004; Huang, C. M., 2004; Oliveira et al., 2007).

## INFEÇÕES DA CAVIDADE ORAL

Diversas estirpes presentes na placa bacteriana são responsáveis pelo aparecimento de doenças orais, sendo as cáries dentárias e as doenças periodontais as infeções que mais se destacam na cavidade oral. Estudos independentes (Marsh & Devine, 2011; Peters et al., 2012) mostraram que as cáries estão associadas ao aumento da presença de bactérias produtoras de ácido láctico, nomeadamente o *Streptococcus mutans*, uma bactéria gram-positivo e o *Lactobacillus acidophilus*. Estas bactérias apresentam a capacidade de metabolizar rapidamente hidratos de carbono, nomeadamente a sacarose e a frutose ingeridas na alimentação, libertando ácido láctico para o meio. A acidificação do meio favorece a desmineralização do esmalte, correspondente à dissolução da HAP, e caso o

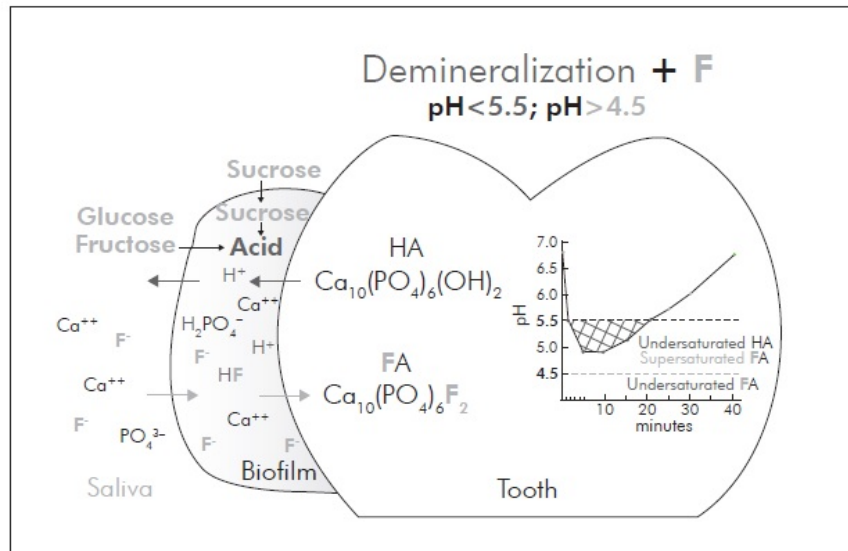
processo de remineralização esteja comprometido, por exemplo por uma deficiente neutralização do ácido em situações de ingestão continuada de açúcares, desenvolve-se a doença cárie. (Fig. 9) (Garcia-Godoy et al., 2008; Marsh, 2006; Peters et al., 2012).



**Figura 9.** Metabolismo das bactérias produtoras de ácido láctico e consequente desmineralização (Hannig et al., 2010)

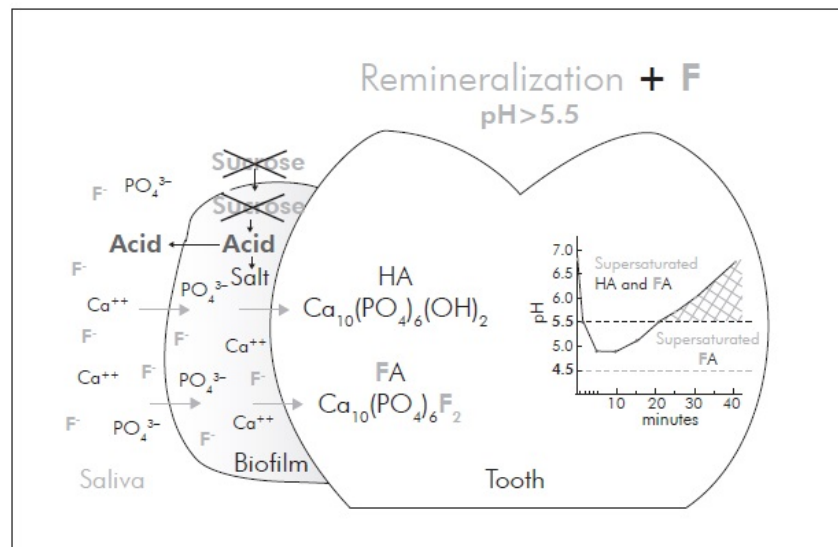
É importante a existência de flúor nos biofilmes e na saliva, uma vez que o íon  $F^-$  consegue substituir o  $OH^-$  na HAP, originando a fluorapatite (FAP),  $Ca_{10}(PO_4)_6F_2$ , sendo que uma baixa quantidade de íons  $F^-$  é suficiente para favorecer a remineralização face a desmineralização (Garcia-Godoy et al., 2008). Tal acontece devido ao facto do flúor, por um lado apresentar isomorfismo com o  $OH^-$ , por outro ser um ligando mais forte e formar complexos mais estáveis com metais duros como o cálcio. Em consequência, a FAP é mais estável do que a HAP.

O flúor apresenta um duplo papel na proteção da doença cárie: desfavorece o processo de desmineralização e promove a remineralização após neutralização do ácido láctico. Após a ingestão de uma dieta rica em açúcares, os valores de pH na cavidade oral baixam e a HAP superficial tende a assumir uma forma menos cristalina e mais amorfa, que facilita a sua dissolução. Nesta fase, se no meio estiverem presentes íons  $F^-$  ocorre a substituição isomórfica do  $OH^-$ , formando-se FAP mais facilmente do que ocorre a dissolução da HAP em  $Ca^{2+}$  e  $HPO_4^{2-}$  (Fig. 10). À medida que o meio se torna mais



**Figura 10.** Desmineralização na presença do íon flúor no biofilme após refeição rica em açúcares (Cury et al., 2009)

alcalino (na ausência de açúcar), os íons  $\text{F}^-$  presentes à superfície do dente promovem a remineralização, na medida em que a precipitação em FAP é mais favorável que em HAP (Fig. 11) (Cury et al., 2009).



**Figura 11.** Desmineralização na presença do íon flúor no biofilme finda a exposição aos açúcares e após neutralização do ácido pela saliva (Cury et al., 2009)

As doenças periodontais consistem em infecções e em condições inflamatórias das gengivas devido às interações entre biofilmes na parte supragengival e subgengival e a resposta inflamatória do hospedeiro. São responsáveis por diversos sintomas como o sangramento das gengivas, a formação de espaços entre a gengiva e a superfície dentária e perda de dentes. Existem vários organismos responsáveis por esta infecção, dos quais se destacam a *Porphyromonas gingivalis*, a *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, a *Tannerella forsythia* e a *Treponema denticola* (Gurenlian, 2007). Durante a maturação do biofilme, os compostos solúveis produzidos pela bactéria penetram no tecido gengival, o que induz uma resposta imunológica no hospedeiro que leva à produção de mediadores químicos (IL-1, prostaglandinas, TNF- $\alpha$ , citocinas, células-T), associados a uma resposta inflamatória. O resultado da inflamação crónica será a degradação do tecido gengival, progredindo de um caso de gengivite para um de periodontite (Marsh, Moter, et al., 2011; Peters et al., 2012). Musskopf e seus colaboradores (Oppermann et al., 2012) mostraram que as infecções periodontais que evoluem no sentido da invasão bacteriana do sistema circulatório, ou mesmo da libertação dos seus metabolitos na corrente sanguínea, estão relacionadas com doenças sistémicas como por exemplo as doenças cardiovasculares.

## AGENTES DE PREVENÇÃO CONTRA BIOFILMES DENTÁRIOS

A higiene oral representa hoje em dia um ponto crítico na imagem do ser humano e na sua relação interpessoal, pessoal e profissional (Pedrazzi et al., 2009). Sendo os biofilmes dentários responsáveis por diversas infecções da cavidade oral, é fundamental remover a agregação de microorganismos e prevenir o desenvolvimento dos mesmos. Os agentes de prevenção disponíveis atualmente podem ser agrupados em agentes mecânicos, agentes químicos ou agentes mistos, sendo estes últimos uma associação dos dois primeiros (Gebran et al., 2002).

### Controlo mecânico

O controlo mecânico é o mecanismo mais comum na prevenção da formação de biofilmes dentários e certamente na prevenção das infecções orais. Consiste no recurso a técnicas simples como a escovagem, com escovas de dentes, e ao uso de fio dentário. A eficiência deste processo está diretamente ligada com a regularidade da higiene oral da

pessoa, sendo que os dentes devem ser escovados entre 2 a 3 vezes ao dia e após a escovagem deve ser utilizado fio dentário entre os dentes (Gebran et al., 2002; Toassi et al., 2002).

A escova de dentes é o utensílio mais utilizado na manutenção da higiene oral. Existem vários tipos de escovas com diferentes características, que permitem o seu bom desempenho em todas as superfícies dentais por parte do utente, como a dureza, o ângulo da cabeça e a altura dos filamentos. Não existe a escova ideal, cada uma apresenta as suas características diferentes conforme a sua funcionalidade, apenas é essencial remover a placa bacteriana presente na superfície dos dentes sem danificar os tecidos gengivais ou criar fissuras no esmalte dentário (Pedrazzi et al., 2009). A *American Dental Association* (ADA) expõe que em média uma escova de dentes apresenta a durabilidade entre três a quatro meses consoante a frequência da sua utilização e a técnica de escovação aplicada, no caso de uma escova ser do tipo “macio” torna-se mais difícil a remoção da placa bacteriana ao longo do tempo, ou seja, mais rápido é o seu desgaste. Apesar de ser um material extremamente eficaz na sua função, estudos têm demonstrado que mesmo nova e sem uso não se encontram esterilizadas, existe a presença de vários microorganismos que têm tendência a aumentar o seu número após a sua primeira utilização, uma vez que é suscetível à contaminação dado ter estado em contacto com os biofilmes orais ou durante o tempo em que não é utilizada, devido a este facto de funcionar como um veículo de bactérias é importante aconselhar o utente a assegurar a higiene do material, para isso aconselha-se a lavar a cabeça da escova com água da torneira antes e após a sua utilização (Mobin et al., 2011; Pedrazzi et al., 2009).

Existem outros tipos de escovas designadas por escovas de dentes elétricas comercializadas no mercado que são preferidas por alguns utentes, estas permitem também a sua utilização na prevenção da placa bacteriana por parte de grupos específicos de pessoas, como é o exemplo de apresentar uma grande vantagem a pessoas inadaptadas fisicamente ou na adesão das crianças à escovagem. Normalmente estas escovas contêm uma cabeça circular e mais comprimida que permite um maior alcance nas zonas interdentais comparadas com as tradicionais, ou seja, uma maior prevenção contra agentes bacterianos (Murrey et al., 2003).

A escovagem consiste no processo mecânico da remoção dos biofilmes orais em que é utilizado a escova dentária, existem várias técnicas para este processo sendo a mais comum designada por técnica de *Bass* que consta em rotações sucessivas num ângulo de 45° entre a cabeça da escova e o eixo dentário sobrepondo uma pressão contra a superfície



dentária até à gengiva durante um determinado tempo, sendo a média cerca de 60 segundos (Gebran et al., 2002). Este processo é realizado juntamente com a pasta dentífrica, um agente químico constituído por diversos compostos que oferece vantagens para a promoção da higiene oral e que será melhor interpretado ao longo desta revisão (Addy, 2003).

O processo da escovagem por si só não é suficiente na remoção da placa bacteriana, para promover uma melhor eficácia na prevenção dos biofilmes orais utiliza-se outro agente mecânico complementar designado por fio dentário. Este dispositivo auxiliar interdental é utilizado após a escovagem e visto como o melhor agente interdentário, segundo o *Council on Dental Therapeutics of ADA* o fio apresenta 80% de eficácia na remoção de microorganismos nos espaços interdentais (Pedrazzi et al., 2004). O fio dental, como as escovas também tem sofrido mudanças no seu desempenho e nos seus constituintes, e estão disponíveis no mercado comercial diversas formas como por exemplo, mais espalmados, com sabor, mais finos, mais grossos, alguns apresentam fluoreto na sua constituição com o objetivo de embeber a superfície dental (Gebran et al., 2002; Pedrazzi et al., 2009).

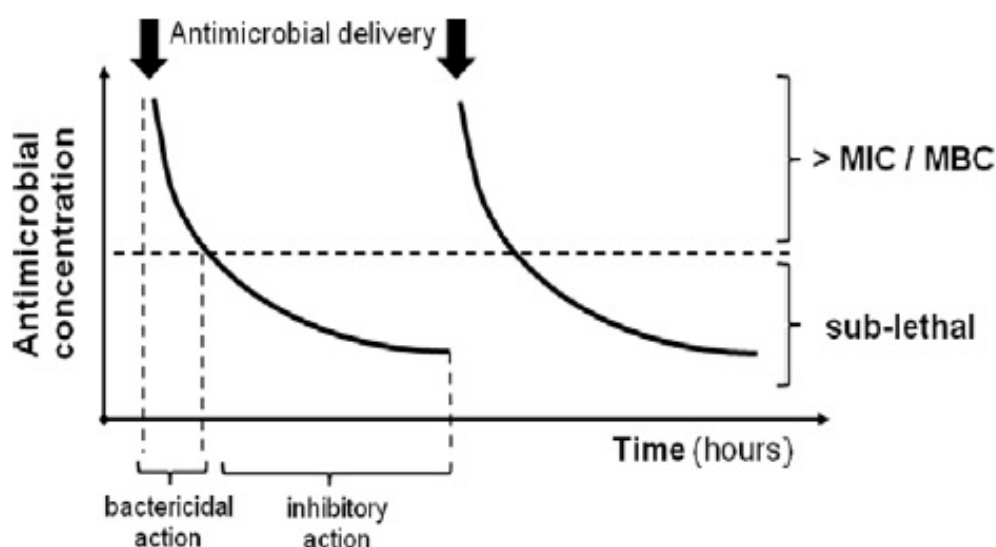
### **Controlo químico**

Os agentes químicos existentes em diferentes classes atuam como complementaridade aos agentes mecânicos na prevenção da formação e na remoção de biofilmes, e consequentemente no aparecimento de doenças orais. Devido ao facto de o controlo mecânico descrito anteriormente ser por vezes insuficiente nesta prevenção, os agentes antimicrobianos têm sido alvo de estudos e aparecem no mercado comercial diversas marcas na forma de colutórios e dentífricos como se pode observar na tabela 3 (Baehni et al., 2003; Pan et al., 2010; Teles et al., 2009).

O mecanismo de ação destes agentes de prevenção química antimicrobiana atua com base na concentração mínima inibitória (CMI) ou na concentração mínima bactericida (CMB), estas concentrações são específicas para cada microorganismo e são determinadas através do contacto da bactéria e o agente químico em questão em placas de laboratório entre 24 a 48 horas. No entanto estes antissépticos devem ser utilizados num bochecho com cerca de dois minutos de modo a permitir a presença da sua concentração com atividade biológica suficiente nas mucosas orais e no esmalte dentário durante algum tempo como se pode observar na figura 12 (Marsh, 2010).

**Tabela 3.** Classes e exemplos de inibidores utilizados como agentes químicos antimicrobianos em colutórios e dentífricos. Adaptado de (Marsh, 2010)

Classes	Exemplos
Bisbiguanida	Cloro-hexidina
Óleos essenciais	Mentol, eucaliptol
Iões metálicos	Cobre, zinco, estanho
Moléculas naturais	Extractos de plantas
Fenóis	Triclosan
Compostos quaternários de amónia	Cloreto de cetilpiridínio

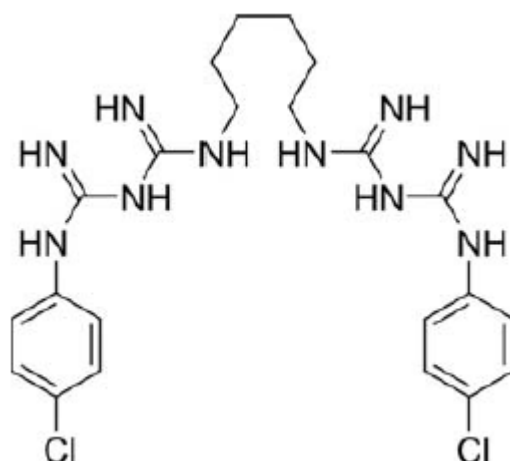


**Figura 12.** Gráfico da relação entre a concentração do antimicrobiano em função do tempo. A concentração do agente deve estar sempre acima da CMI e CMB (Marsh, 2010)

### *Cloro-hexidina*

A cloro-hexidina (CHX) é uma bisbiguanida catiónica, este composto químico é o mais utilizado na prevenção dos biofilmes dentais, uma vez que apresenta um elevado poder antisséptico, ou seja, tem a capacidade de matar bactérias presentes na boca e na língua. A sua escolha numa vasta gama de produtos comerciais, como colutórios e géis dentífricos, deve-se ao seu largo espectro contra bactérias gram-positivo e gram-negativo

incluindo vários microorganismos patogênicos anaeróbios, a CHX é também utilizada em diversos produtos farmacêuticos por exemplo soluções oftálmicas, como conservante por ser um composto que apresenta uma baixa toxicidade para as células humanas (Cheung et al., 2012; Solmaz et al., 2013). Os efeitos significativos da CHX na placa bacteriana têm sido notáveis e alvos de vários estudos recentes na redução da formação da película primária e na adesão de microorganismos na superfície do dente (Solmaz et al., 2013).

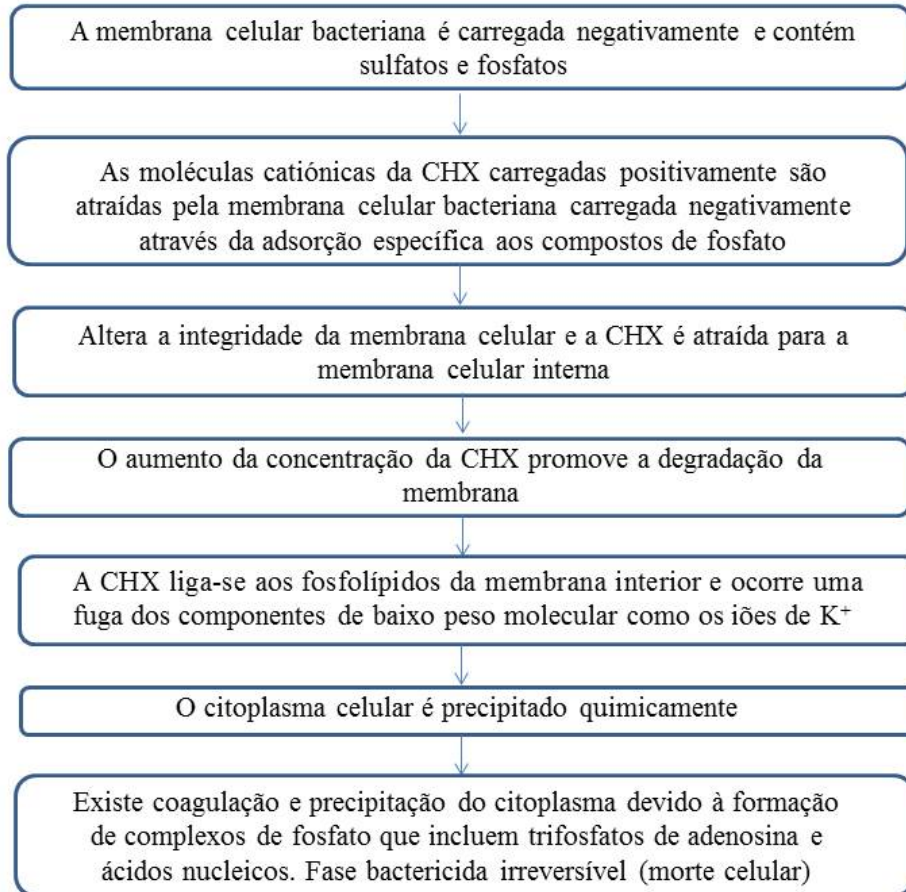


**Figura 13.** Estrutura da CHX.

O seu efeito antimicrobiano deve-se às propriedades de atração e adsorção das suas moléculas catiónicas nas superfícies celulares bacterianas que alteram a permeabilidade da membrana celular, isto provoca o desequilíbrio celular e osmótico e a perda de componentes intracelulares (Bonez et al., 2013). A diferença de ação que a CHX apresenta contra as bactérias gram-positivo e gram-negativo ainda não se encontra bem documentada mas é conhecido que o seu mecanismo de ação envolve interações de adsorção das moléculas catiónicas com os compostos de fosfato aniônico das moléculas lipídicas presentes na membrana celular, os compostos de CHX atravessam a membrana celular, penetram a membrana citoplasmática para provocar a fuga dos componentes de baixo peso molecular, ou seja, ocorre a precipitação do citoplasma através da formação de complexos com os grupos funcionais de fosfato e a consequente morte celular como se observa na figura 14 (Cheung et al., 2012; Solmaz et al., 2013).

Contudo, apesar da sua boa eficácia como antibacteriano o uso prolongado da CHX apresenta efeitos adversos como a coloração acastanhada na superfície dentária, nas

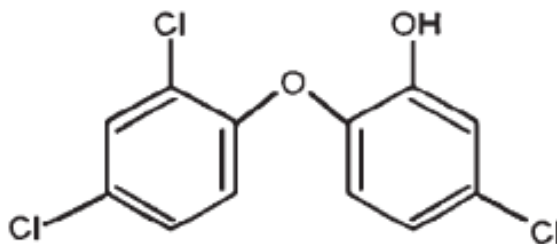
restaurações e na língua, pode provocar também perturbações ao nível do paladar (Balagopal et al., 2013; Solmaz et al., 2013).



**Figura 14.** Mecanismo de Ação da CHX (Balagopal et al., 2013)

### *Triclosan*

O triclosan (TCS) é o agente químico antibacteriano mais potente da classe dos fenóis. A maior parte dos dentífricos disponíveis comercialmente apresentam uma concentração variável deste fenol na sua constituição, devido à sua estrutura não-iónica compatível com as várias formulações dentífricas de diversos produtos de higiene oral e ostenta uma razoável substantividade nas mucosas orais. Este antibacteriano possui um amplo espectro de ação contra a maior parte das bactérias presentes na placa bacteriana (Gram-positivo e Gram-negativo) e vários estudos têm sido realizados com o fim de aumentar a sua eficácia e retenção na cavidade oral com associação a outras substâncias



**Figura 15.** Estrutura do TCS

presentes nos dentífricos como o citrato de zinco ou um copolímero responsável pelo controle da libertação da substância (Finney et al., 2003).

Os produtos de higiene oral contendo a associação do agente TCS e de um copolímero como o polivinilmetiléter, nas concentrações de 0.3% e de 2% respectivamente, têm demonstrado uma eficácia significativa na prevenção da formação da placa bacteriana. O copolímero tem a capacidade de aumentar a retenção, ou seja, a substantividade do TCS nas superfícies dentárias, saliva e nas mucosas orais e testes demonstram que formulações com esta associação reduzem as proporções de bactérias vitais na placa até 24 horas (Teles et al., 2009).

O TCS tem a capacidade de romper a membrana celular, é considerado um agente ativo da membrana que causa perturbações na estrutura membranar com o fim de alterar a permeabilidade da mesma (Phan et al., 2006). O seu mecanismo de ação insere-se nas suas atividades específicas anti enzimáticas e na sua potente capacidade inibidora da enzima enoil-ACP redutase (proteína transportadora de acilo), também denominada por FabI, responsável pelo alongamento dos ácidos gordos nas bactérias. Diversas bactérias como os *Streptococcus mutans* responsáveis pelas cáries dentárias como já referido anteriormente nesta revisão, não apresentam o gene FabI mas o gene FabM que codifica para a proteína FabM a mesma atividade da enzima enoil-ACP redutase, estes microorganismos têm tendência a serem mais resistentes à atividade do TCS uma vez que o agente antibacteriano não afeta esta proteína, esta resistência têm sido alvo de alguns estudos científicos (Gilbert et al., 2007).

Assim, pequenas concentrações de TCS são responsáveis pela morte celular nas bactérias portadoras da proteína FabI, no entanto concentrações mais altas permitem afetar diferentes alvos adicionais (Phan et al., 2006). Diversos estudos publicados e não publicados demonstram que diversos produtos de saúde oral como os dentífricos e colutórios que contêm TCS na sua constituição não apresentam qualquer tipo de

toxicidade para o organismo sendo segura a sua utilização nas concentrações indicadas (Bhargava et al., 1996).

### *Óleos essenciais*

Os óleos essenciais, tal como os dois agentes químicos de prevenção nos biofilmes orais descritos acima nesta revisão também apresentam um amplo espectro de ação contra as bactérias orais gram-positivo e gram-negativo, são compostos complexos, voláteis, metabolitos secundários derivados de plantas aromáticas e os seus complexos presentes na estrutura química permitem explicar a sua atividade clínica, exemplos são o timol, eucaliptol, mentol e o salicilato de metilo. O produto farmacológico disponível no mercado comercial mais conhecido, que apresenta estes óleos é o colutório Listerine® da *Johnson & Johnson*, que será melhor interpretado ao longo da revisão (Brading et al., 2003; Freires et al., 2015).

A eficácia dos agentes antibacterianos orais é normalmente conhecida pela sua capacidade bactericida, e apesar do seu mecanismo de ação estar relacionado também com a rutura da membrana celular e a inibição enzimática, os óleos essenciais possuem propriedades que permitem interferir na colonização bacteriana das superfícies dentárias, este agente de prevenção químico inibe a agregação das bactérias pioneiras gram-positivo ao esmalte dentário, atrasa a multiplicação bacteriana e consegue extrair as endotoxinas dos microorganismos patogénicos gram-negativo. Estes mecanismos permitem uma redução da carga bacteriana, uma diminuição na velocidade da maturação do biofilme dentário e respetivamente uma diminuição da massa da placa e da sua patogenicidade (Teles et al., 2009).

Os colutórios tradicionais compostos por óleos essenciais contêm etanol na sua formulação a uma concentração de cerca de 20%, o suficiente para dissolver os óleos mas que não permite o seu efeito antisséptico direto. A presença deste álcool nestes produtos farmacêuticos orais tem sido contestada devido aos seus efeitos nas restaurações de resina realizadas pelos médicos dentistas e a sua possível relação com o aparecimento do cancro da orofaringe, apesar de não existir associação direta desta doença com o uso de colutórios. Devido a este facto têm surgido estudos focados na produção de novos produtos sem etanol que podem apresentar menos efeitos colaterais mas consequentemente menos eficácia (Marchetti et al., 2011).

Produtos naturais como as catequinas da família dos polifenóis presentes no chá verde têm demonstrado aptidão para inibir o crescimento bacteriano, a aglomeração da placa e o desenvolvimento de cáries dentárias. São vários os produtos naturais que têm surgido como alternativas à prevenção terapêutica das cáries ou no controlo da placa bacteriana. A formação de óleos essenciais de compostos isolados do limão demonstram diversas aplicações biológicas como atividade antibacteriana e antifúngica, um estudo reporta que este óleo afeta a estrutura e a capacidade funcional da membrana de *Streptococcus mutans* inibindo as enzimas respiratórias e alterando o sistema energético das células, tornando-se num agente candidato à profilaxia bacteriana que não influencia a microflora oral. Foi demonstrada também a sua capacidade de inibir a adesão de *S. mutans* ao esmalte dentário revestido de saliva. Contudo, estudos nestes novos compostos ainda continuam limitados (Liu et al., 2013).

### *Flúor*

A presença do ião fluoreto como aditivo é comum nas formulações das pastas dentífricas nas concentrações entre 1000 a 1500 ppm como fluoreto de sódio (NaF) ou monofluorofosfato de sódio devido à sua actividade antiplaquetária e antimicrobiana (Brading et al., 2003). Este ião é reconhecido pela *US Food and Drug Administration* (FDA) como o agente de primeira linha na prevenção da cárie dentária encontrando-se nas águas comunitárias fluoretadas, dentífricos e colutórios (Carey, 2014).

O flúor tem a capacidade de inibir diversas enzimas bacterianas directa ou indirectamente por acidificar o interior das células, permitindo a redução da taxa de produção dos ácidos da ingestão de hidratos de carbono na placa bacteriana. Uma pequena variação no pH oral impede também o crescimento de bactérias tolerantes ao ácido como os *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* associadas à doença oral. No entanto, o efeito do flúor na remineralização do esmalte dentário permite um efeito bastante benéfico na prevenção das cáries dentárias *in vivo*. Noções recentes sugerem que este efeito preventivo se deve aos níveis de concentração do ião presentes no fluido salivar entre os dentes que altera o balanço da desmineralização (responsável pela cárie) do esmalte para a remineralização devido à precipitação dos fosfatos de Ca e a formação da fluorapatite (FAP) mais resistente aos ácidos (Brading et al., 2003).

O uso incorreto e constante de flúor pode provocar manchas esbranquiçadas nas superfícies dentárias denominadas por fluorose, como se pode observar na figura 16, principalmente nas crianças até aos 12 anos de idade (Li, X. et al., 2014).



**Figura 16.** Exemplos de fluorose (Carey, 2014)

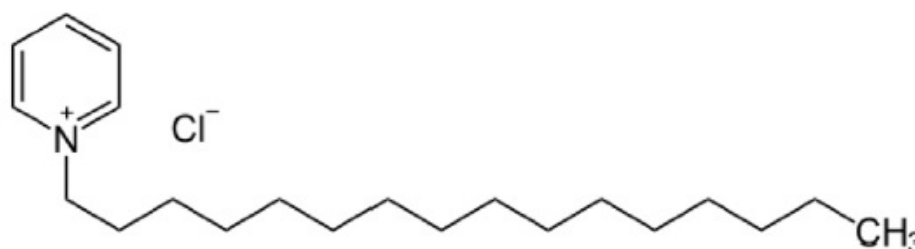
Como solução para a diminuição do risco de fluorose nas crianças reduziu-se as concentrações do ião fluoreto na composição das pastas de dentes das crianças para cerca de 500ppm mas esta redução não se mostrou tão efetiva como as concentrações normais, mas outros estudos suportam que a adição de baixas concentrações de fosfatos orgânicos e inorgânicos conseguem aumentar a efetividade da mesma, um estudo *in vivo* prova que bochechar com baixas concentrações de lactato de cálcio antes de bochechar com pequenas concentrações de flúor permite uma maior substantividade da concentração do flúor na cavidade oral e na saliva em cerca de uma hora (Dogan et al., 2004; Zaze et al., 2014).



Foi também demonstrado que quando o flúor está presente noutros compostos como fluoreto estanoso ou fluoreto de amina, possui propriedades antibacterianas substanciais demonstradas pelos componentes associados ao ião fluoreto. O fluoreto de amina apresenta propriedades ativas na superfície dentária e pode inibir a adesão de bactérias ao esmalte, no caso do fluoreto estanoso as propriedades terapêuticas são atribuídas ao ião  $\text{Sn}^{2+}$ , que tem mostrado ser clinicamente efetivo (Brading et al., 2003).

### *Cloreto de cetilpiridínio*

O cloreto de cetilpiridínio (CPC) é um composto quaternário catiónico de amónia com uma longa história de eficácia demonstrada clinicamente e em vários estudos in vivo como um agente químico de prevenção no controlo da placa bacteriana e de gengivites com um amplo espectro de ação contra bactérias gram-negativo. O uso de CPC como colutório nos Estados Unidos da América ocorre há cerca de 70 anos e este composto é classificado segundo a FDA como classe I nas categorias de eficácia e de segurança respetivamente (Alves et al., 2012; Latimer et al., 2015; Sreenivasan et al., 2013).



**Figura 17.** Estrutura do CPC (Marotta-Oliveira et al., 2011)

Colutórios contendo CPC na sua constituição demonstram uma CMI baixa possibilitando uma óptima actividade antimicrobiana contra bactérias gram negativas responsáveis por periodontites como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* (Sreenivasan et al., 2013). Os agentes desta classe são carregados positivamente e tornam-se catiónicos, o que permite que ocorra mais facilmente uma ligação aos tecidos orais e às superfícies bacterianas carregadas negativamente. O seu mecanismo de ação é comum aos diferentes agentes químicos antiplaquetários, actua ao nível da membrana celular bacteriana causando perturbações no metabolismo, perda de componentes celulares e consequentemente a morte celular, no

entanto a sua substantividade comparativamente à CHX é inferior (Alves et al., 2012; Sreenivasan et al., 2013).

A associação de CPC em produtos como pastas dentífricas é complicada devido às suas interações com os outros compostos presentes na formulação das mesmas (Alves et al., 2012). Mas, pesquisas clínicas têm demonstrado colutórios que contêm CPC e NaF na sua formulação, são eficazes na redução da placa bacteriana e são eficazes comparados com bochechos de produtos apenas contendo NaF na prevenção da desmineralização do esmalte dentário o que indica que o CPC não interfere com as actividades do ião fluoreto (Latimer et al., 2015). Apesar da sua eficácia como agente químico, o seu uso prolongado pode provocar manchas dentífricas e quando utilizado em altas concentrações pode provocar pigmentação nas superfícies dentárias ou sensação de ardor (Alves et al., 2012).

### *Pastilhas Elásticas*

A área das pastilhas elásticas sem açúcar como agentes de saúde oral é recente e tende a expandir no futuro, as suas propriedades de prevenção contra as cáries dentárias têm demonstrado uma boa eficácia em diversos estudos e ensaios clínicos, também têm sido feitos estudos nas suas propriedades de limpeza mas os resultados acerca da sua actividade antiplaquetária nas superfícies dentárias mostram-se inconclusivos (Brading et al., 2003; Pizzo et al., 2007). Para aumentar a eficácia das pastilhas na saúde oral incorpora-se aditivos nas suas formulações como enzimas, abrasivos e iões metálicos divalentes por o exemplo o ião  $Zn^{2+}$  (Pizzo et al., 2007).

As pastilhas elásticas podem ser utilizadas como estimulantes salivares, este processo é essencial na remoção dos restos alimentares presentes na cavidade oral, após a alimentação de alimentos ricos em açúcar é notável uma diminuição do pH devido à produção de ácidos das bactérias acidogéneas como o *Streptococcus mutans*, mascar pastilhas por vezes pode promover um rápido aumento do pH na cavidade oral, isto acontece porque a mastigação consegue proporcionar um efeito tampão da saliva que consegue neutralizar os ácidos presentes na cavidade oral, pastilhas sem açúcar e com açúcar demonstram também um efeito positivo na remineralização dentária, mas devido à possibilidade do aparecimento de cáries dentárias das pastilhas com açúcar, é benéfico o uso das sem açúcar. Este agente e rebuçados que contêm citrato de zinco na sua constituição podem ser encontrados no mercado comercial de algumas regiões e existe a

possibilidade de surgirem novos produtos no futuro com efeitos benéficos no cuidado oral (Brading et al., 2003).

### **Segurança dos agentes antimicrobianos orais**

Apesar da eficácia dos agentes de prevenção químicos orais e da recomendação à sua utilização como adjuvante aos mecanismos mecânicos, estes devem ser controlados na utilização e não devem ser tomados de forma exagerada. Sendo assim, o uso destes produtos farmacêuticos sugere duas preocupações que devem ser conhecidas para o aumento da segurança destes agentes, o risco de crescimento de defesas resistentes do microorganismo e o risco de contrair cancro oral associado às formulações dos produtos contendo álcool. Os antissépticos bucais apresentam um amplo espectro contra as bactérias presentes na cavidade oral mas sem um mecanismo específico contra os microorganismos, portanto isto afeta uma diversidade de componentes celulares o que permite o não desenvolvimento de bactérias resistentes aos agentes antimicrobianos. Vários estudos demonstraram que não existe o aparecimento de doenças oportunistas, ou o crescimento de bactérias resistentes, várias mutações podem ocorrer contra um mecanismo de ação antibacteriano de um certo colutório mas raramente seria possível o aparecimento de resistências contra os restantes mecanismos. Relativamente às preocupações que surgem devido ao álcool estar relacionado com o aparecimento de cancro na orofaringe conduziram a estudos da parte da FDA e da ADA que permitiram concluir que o aparecimento da doença não está associada aos bochechos com produtos contendo álcool, sendo assim segura a utilização destes agentes químicos de prevenção (Teles et al., 2009).

### **Produtos comercializados**

São diversos os produtos antibacterianos atuais no mercado farmacêutico e comercial. Os vários ensaios clínicos *in vivo* existentes permitem a produção de uma vária gama de produtos de diversas marcas produzidas por diferentes laboratórios.

Em Portugal, existe o produto comercial denominado por Bexident® (figura 18) da Isdin disponível nas farmácias, é uma solução bucal, que contém na sua formulação 0,12% de gluconato de clorohexidina, utilizado na profilaxia das gengivites caracterizadas por inchaço ou vermelhidão das gengivas inclusive sangramento gengival e no controlo da placa bacteriana, devem ser feitos bochechos cronometrados em cerca

de 60s, três vezes ao dia após as refeições e não deve ser feita a ingestão de quaisquer alimentos ou líquidos nos 30min seguintes. As contra-indicações deste produto refletem-se em pessoas com hipersensibilidade à CHX ou outros produtos presentes na constituição de Bexident®, e o seu uso prolongado como descrito no capítulo acima, pode desencadear manchas dentífricas e possíveis alterações no paladar. Este produto também está disponível na forma de gel dentífrico utilizado na escovagem 2-3 vezes ao dia entre 2-3min (Gurenlian, 2007; Isdin, 2015).



**Figura 18.** Solução bucal Bexident® de 0,12% de gluconato de clorohexidina (Isdin, 2015)

Outro produto comercializado nas farmácias portuguesas também é o Bexident® (figura 19), um colutório formulado por triclosan e NaF, este produto é indicado na manutenção da saúde periodontal e na prevenção de gengivites, a associação com o NaF permite um efeito complementar anti cárie e possui ação anticéptica, a sua posologia é feita 2-3 vezes ao dia num bochecho (cerca de 60 s). Este colutório está contra-indicado em crianças com idades inferiores aos 6 anos (Isdin, 2015).



**Figura 19.** Colutório Bexident® formulado com triclosan e NaF

Em relação aos óleos essenciais o produto mais conhecido no mercado e que pode ser encontrado nas farmácias portuguesas e nas grandes superfícies é o Listerine® distribuído pela *Johnson & Johnson Healthcare Products*. Dentro da marca Listerine® existem diversos elixires focados em vários problemas da saúde oral. O Listerine® *Total Care* (figura 20) é uma associação combinada de quatro óleos essenciais, mentol, eucaliptol, timol e salicilato de metilo, com flúor e cloreto de zinco (mecanismos descritos nos capítulos acima) e apresenta uma eficácia estudada *in vitro* de 99.9% na eliminação das bactérias da cavidade oral utilizado como complemento à remoção mecânica, os complementos de flúor e cloreto de zinco permitem reforçar o esmalte dentário e a prevenção de tártaro respetivamente. Deve ser utilizado 2 vezes por dia após a escovagem dentária numa dose de 20ml e em bochechos de cerca de 30s, este produto está contraindicado em crianças com idade inferior a 12 anos (Johnson & Johnson, 2014).



**Figura 20.** Elixir Listerine® *Total Care* (Johnson & Johnson, 2014)

O cloreto de cetilpiridínio descrito anteriormente nesta revisão como agente químico na prevenção dos biofilmes orais é encontrado em diversos produtos comerciais em Portugal sendo um deles o Periogard Plus® da Colgate® (figura 21), este produto é um elixir de uso oral diário desenvolvido para a eliminação da placa bacteriana sendo eficaz no tratamento de gengivites, hemorragias e tem a capacidade de neutralizar os compostos sulfurosos voláteis responsáveis pelo mau hálito, a sua formulação é constituída por uma concentração de 0,05% de CPC. A forma indicada do uso deste colutório baseia-se no bochecho de duas vezes ao dia de Periogard Plus® após a escovagem durante 30s, este produto está contra-indicado em crianças com idade inferior a 6 anos (Colgate-Palmolivecompany, 2015).



**Figura 21.** Elixir Periogard Plus® de cloreto de cetilpiridínio a 0,05% (Colgate-Palmolivecompany, 2015)

## CONCLUSÃO

Ao longo desta revisão bibliográfica foram interpretados diversos temas da cavidade oral e diferentes fármacos com mecanismos de ação distintos nas suas funções protetoras contra os biofilmes dentários. Como revisto anteriormente, os processos químicos do esmalte, saliva, pH estão relacionados entre si, o equilíbrio entre eles permite a manutenção da saúde oral. Os agentes de prevenção mecânicos e químicos são hoje em dia alvo de diversos estudos, são produzidos por vários laboratórios e marcas comerciais. Em relação aos agentes mecânicos, como a escova dentária e o fio dentário, demonstram ser a primeira defesa contra a placa bacteriana. As escovas estão disponíveis em diversas tipologias (suaves ou duras) variando com o tipo de escovagem ou aconselhamento do médico dentista e devem ser utilizados em associação com os colutórios químicos, para uma maior eficácia após a escovagem. Os agentes químicos apresentam, geralmente, um amplo espectro de ação contra os microorganismos, como é o caso da CHX, TCS ou CPC. Porém, é importante reconhecer que a utilização exagerada de CHX ou CPC poderá ter efeitos adversos como a pigmentação no esmalte ou alterações a nível do paladar. Também é possível a associação destes fármacos com outras substâncias com a finalidade de aumentar a substantividade do fármaco (TCS associado a um copolímero) na cavidade oral, ou para um aumento do espectro de absorção no caso dos óleos essenciais como o Listerine® (mentol, eucaliptol, timol e salicilato de metilo). A presença do ião  $F^-$  nas águas públicas e nas pastas dentífricas promove a remineralização mas o excesso das concentrações deste componente no esmalte dentário é responsável pela fluorose. Assim se demonstra que, apesar de seguros e extremamente bem aceites na manutenção da saúde oral, estes agentes devem ser controlados na sua utilização. As pastilhas elásticas sem açúcar demonstram alguns efeitos contra os biofilmes dentários, mas devem ser maiores os estudos nesta área. Revela-se necessário o desenvolvimento deste tipo de agentes no sentido de permitirem a redução dos efeitos adversos, quer por investimento em novas formulações químicas, quer por associação das existentes. Não obstante a necessidade de mais estudos clínicos, os resultados que se têm obtido demonstram que a utilização deste tipo de fármacos é vantajosa na prevenção da placa bacteriana.

Mesmo sendo de conhecimento geral que é necessário a escovagem diária dos dentes e o uso de fio dentário para a remoção da placa bacteriana, continuam a se comuns as doenças orais associadas à acumulação de placa bacteriana. As cáries dentárias representam um problema de saúde pública, principalmente nas crianças, tendo os

profissionais de saúde em geral, e os farmacêuticos em particular, o importante papel de educarem os utentes na utilização eficaz destes produtos. Para isso, devido à sua venda nas farmácias comunitárias, todo o farmacêutico necessita de conhecer a posologia e os efeitos adversos no sentido de esclarecer qualquer questão por parte do utente.



## BIBLIOGRAFIA

- Addy, M. (2003). Escovagem, desgaste dentário e hipersensibilidade dentinária—estarão associados? *International Dental*, 55(4), 261-267.
- Aframian, D. J., Davidowitz, T., & Benoliel, R. (2006). The distribution of oral mucosal pH values in healthy saliva secretors. *Oral Dis*, 12(4), 420-423.
- Alves, D., Costa, A. L., Almeida, R. F., Carvalho, J. F., & Felino, A. (2012). Cloreto de cetilpiridínio-revisão da literatura. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 53(3), 181-189.
- Baehni, P. C., & Takeuchi, Y. (2003). Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Dis*, 9 Suppl 1, 23-29.
- Baik, J. E., Hong, S. W., Choi, S., Jeon, J. H., Park, O. J., Cho, K., Seo, D. G., Kum, K. Y., Yun, C. H., & Han, S. H. (2013). Alpha-amylase is a human salivary protein with affinity to lipopolysaccharide of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Mol Oral Microbiol*, 28(2), 142-153.
- Balagopal, S., & Arjunkumar, R. (2013). Chlorhexidine: The Gold Standard Antiplaque Agent. *Journal of Pharmaceutical Sciences & Research*, 5(12), 270-274.
- Bardow, A., Moe, D., Nyvad, B., & Nauntofte, B. (2000). The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO<sub>2</sub>. *Arch Oral Biol*, 45(1), 1-12.
- Bhargava, H. N., & Leonard, P. A. (1996). Triclosan: applications and safety. *Am J Infect Control*, 24(3), 209-218.
- Bonez, P. C., Dos Santos Alves, C. F., Dalmolin, T. V., Agertt, V. A., Mizdal, C. R., Flores Vda, C., Marques, J. B., Santos, R. C., & Anraku de Campos, M. M. (2013). Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. *Am J Infect Control*, 41(12), e119-122.
- Brading, M., & Marsh, P. (2003). The oral environment: the challenge for antimicrobials in oral care products. *International Dental Journal*, 53(S6P1), 353-362.
- Carey, C. M. (2014). Focus on fluorides: update on the use of fluoride for the prevention of dental caries. *J Evid Based Dent Pract*, 14 Suppl, 95-102.
- Carlen, A., Eliasson, L., Aronsson, G., & Birkhed, D. (2004). Human minor and major gland saliva proteins and ability to mediate *Actinomyces naeslundii* adherence. *Arch Oral Biol*, 49(3), 177-181.

- Cheung, H. Y., Wong, M. M., Cheung, S. H., Liang, L. Y., Lam, Y. W., & Chiu, S. K. (2012). Differential actions of chlorhexidine on the cell wall of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *PLoS One*, 7(5), e36659.
- Colgate-PalmoliveCompany (Producer). (2015). Colgate. Acedido a 5 de Outubro de 2015 em <http://www.colgate.pt/app/CP/PT/OC/Products/From-the-Dentist.cvsp>
- Cury, J. A., & Tenuta, L. M. (2009). Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res*, 23 Suppl 1, 23-30.
- Demuyser, L., Jabra-Rizk, M. A., & Van Dijck, P. (2014). Microbial cell surface proteins and secreted metabolites involved in multispecies biofilms. *Pathog Dis*, 70(3), 219-230.
- Dogan, F., Civelek, A., & Oktay, I. (2004). Effect of different fluoride concentrations on remineralization of demineralized enamel: an in vitro pH-cycling study. *Oral Health and Dental Management*, III(1), 20-26.
- Featherstone, J. D., & Lussi, A. (2006). Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci*, 20, 66-76.
- Finney, M., Walker, J. T., Marsh, P. D., & Brading, M. G. (2003). Antimicrobial effects of a novel Triclosan/zinc citrate dentifrice against mixed culture oral biofilms. *Int Dent J*, 53(6 Suppl 1), 371-378.
- Freires, I. A., Bueno-Silva, B., Galvao, L. C., Duarte, M. C., Sartoratto, A., Figueira, G. M., de Alencar, S. M., & Rosalen, P. L. (2015). The Effect of Essential Oils and Bioactive Fractions on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* Biofilms: A Confocal Analysis. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 871316.
- Garcia-Godoy, F., & Hicks, M. J. (2008). Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *J Am Dent Assoc*, 139 Suppl, 25S-34S.
- Gebran, M. P., & Gebert, A. P. O. (2002). Controle químico e mecânico de placa bacteriana. *Tuiuti Ciênc e Cult*, 3(26), 45-58.
- Gilbert, P., McBain, A., & Sreenivasan, P. (2007). Common therapeutic approaches for the control of oral biofilms: microbiological safety and efficacy. *Clin Microbiol Infect*, 13 Suppl 4, 17-24.
- Gurenlian, J. R. (2007). The Role of Dental Plaque Biofilm in Oral Health. *American Dental Hygienists Association*, 81(suppl 1), 116.
- Hannig, M., & Hannig, C. (2010). Nanomaterials in preventive dentistry. *Nat Nanotechnol*, 5(8), 565-569.

- Hilton, T. J., Ferracane, J. L., & Broome, J. (2013). *Fundamentals of Operative Dentistry: A Contemporary Approach* (4th ed.). Chicago, USA: Quintessence Pub Co.
- Huang, C. M. (2004). Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol*, 49(12), 951-962.
- Huang, R., Li, M., & Gregory, R. L. (2011). Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*, 2(5), 435-444.
- Isdin (Producer). (2015). Bexident. Acedido a 6 de Outubro de 2015 em <http://www.isdin.com/eng/products/bexident/gums-treatment-mouthwash-eng>
- Jakubovics, N. S., & Kolenbrander, P. E. (2010). The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. *Oral Dis*, 16(8), 729-739.
- Jayasudha, Baswaraj, H, K. N., & K, B. P. (2014). Enamel regeneration - current progress and challenges. *J Clin Diagn Res*, 8(9), ZE06-09.
- Johnson & Johnson, L. (Producer). (2014). Listerine Total Care. Acedido a 6 de Outubro de 2015 em [http://www.listerine.pt/listerine-total-care?gclid=CjwKEAjwwbyxBRCS74T049iEp0wSJACkO5v1b1kNcrgXFd2E3dWFT2dL\\_rtYkT8KVswZ-flaZ4P2hoCz9\\_w\\_wcB](http://www.listerine.pt/listerine-total-care?gclid=CjwKEAjwwbyxBRCS74T049iEp0wSJACkO5v1b1kNcrgXFd2E3dWFT2dL_rtYkT8KVswZ-flaZ4P2hoCz9_w_wcB)
- Kreth, J., Merritt, J., Shi, W., & Qi, F. (2005). Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *Journal of bacteriology*, 187(21), 7193-7203.
- Latimer, J., Munday, J. L., Buzza, K. M., Forbes, S., Sreenivasan, P. K., & McBain, A. J. (2015). Antibacterial and anti-biofilm activity of mouthrinses containing cetylpyridinium chloride and sodium fluoride. *BMC Microbiol*, 15, 169.
- Lenander-Lumikari, M., & Loimaranta, V. (2000). Saliva and dental caries. *Adv Dent Res*, 14, 40-47.
- Levine, M. (2011). *Topics in Dental Biochemistry*. Berlin, Germany: Springer.
- Li, X., Wang, J., Joiner, A., & Chang, J. (2014). The remineralisation of enamel: a review of the literature. *J Dent*, 42 Suppl 1, S12-20.
- Li, Y. H., & Tian, X. (2012). Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors (Basel)*, 12(3), 2519-2538.
- Liu, Y., Zhang, X., Wang, Y., Chen, F., Yu, Z., Wang, L., Chen, S., & Guo, M. (2013). Effect of citrus lemon oil on growth and adherence of *Streptococcus mutans*. *World J Microbiol Biotechnol*, 29(7), 1161-1167.

- Marchetti, E., Mummolo, S., Di Mattia, J., Casalena, F., Di Martino, S., Mattei, A., & Marzo, G. (2011). Efficacy of essential oil mouthwash with and without alcohol: a 3-day plaque accumulation model. *Trials*, 12, 262.
- Marotta-Oliveira, S. S. A., & Marchetti, J. M. (2011). Determinação de heparina fracionada em preparações farmacêuticas utilizando turbidimetria. *Quim. Nova*, 34(6), 1063-1067.
- Marsh, P. D. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health*, 6 Suppl 1, S14.
- Marsh, P. D. (2010). Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *J Dent*, 38 Suppl 1, S11-15.
- Marsh, P. D., & Devine, D. A. (2011). How is the development of dental biofilms influenced by the host? *J Clin Periodontol*, 38 Suppl 11, 28-35.
- Marsh, P. D., Moter, A., & Devine, D. A. (2011). Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol 2000*, 55(1), 16-35.
- Millward, T., & Wilson, M. (1988). The effect of chlorhexidine on *Streptococcus sanguis* biofilms. *Microbios*, 58(236-237), 155-164.
- Mobin, M., Borba Cde, M., Filho, C. A., Tapety, F. I., Noleto Ide, M., & Teles, J. B. (2011). Analysis of fungal contamination and disinfection of toothbrushes. *Acta Odontol Latinoam*, 24(1), 86-91.
- Murrey, J. J., Nunn, J. H., & Steele, J. G. (2003). *Prevention of Oral Disease* (4th ed.). New York, USA: Oxford University Press.
- Oliveira, M. R., Napimoga, M. H., Cogo, K., Goncalves, R. B., Macedo, M. L., Freire, M. G., & Groppo, F. C. (2007). Inhibition of bacterial adherence to saliva-coated through plant lectins. *J Oral Sci*, 49(2), 141-145.
- Oppermann, R. V., Weidlich, P., & Musskopf, M. L. (2012). Periodontal disease and systemic complications. *Braz Oral Res*, 26(SPE1), 39-47.
- Pan, P. C., Harper, S., Ricci-Nittel, D., Lux, R., & Shi, W. (2010). In-vitro evidence for efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent*, 38 Suppl 1, S16-20.
- Pedrazzi, V., Mattos, M., & Panzeri, H. (2004). Avaliação clínica da eficácia de um fio dental com nova estrutura na remoção do biofilme interdentário. *Rev Assoc Bras Odontol*, 12, 154-159.

- Pedrazzi, V., Souza, S., Oliveira, R., Cimões, R., & Gusmão, E. (2009). Métodos mecânicos para o controle do biofilme dentário supragengival. *Periodontia, Rio de Janeiro*, 19(3), 26-33.
- Peters, B. M., Jabra-Rizk, M. A., O'May, G. A., Costerton, J. W., & Shirtliff, M. E. (2012). Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clin Microbiol Rev*, 25(1), 193-213.
- Phan, T. N., & Marquis, R. E. (2006). Triclosan inhibition of membrane enzymes and glycolysis of *Streptococcus mutans* in suspensions and biofilms. *Can J Microbiol*, 52(10), 977-983.
- Pizzo, G., Licata, M. E., La Cara, M., Pizzo, I., Guiglia, R., & Melilli, D. (2007). The effects of sugar-free chewing gums on dental plaque regrowth: a comparative study. *J Dent*, 35(6), 503-508.
- Roveri, N., Battistella, E., Bianchi, C. L., Foltran, I., Foresti, E., Iafisco, M., Lelli, M., Naldoni, A., Palazzo, B., & Rimondini, L. (2009). Surface Enamel Remineralization: Biomimetic Apatite Nanocrystals and Fluoride Ions Different Effects. *Journal of Nanomaterials*, 2009, 9.
- Shani, S., Friedman, M., & Steinberg, D. (2000). The anticariogenic effect of amine fluorides on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase in biofilms. *Caries Res*, 34(3), 260-267.
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*, 28, 12-55.
- Solmaz, G., & Korachi, M. (2013). Inhibition and Disruption Properties of Chlorhexidine Gluconate on Single and Multispecies Oral Biofilms. *Jundishapur J Microbiol*, 6(1), 61-66.
- Sreenivasan, P. K., Haraszthy, V. I., & Zambon, J. J. (2013). Antimicrobial efficacy of 0.05% cetylpyridinium chloride mouthrinses. *Lett Appl Microbiol*, 56(1), 14-20.
- Takahashi, N., Ishihara, K., Kato, T., & Okuda, K. (2007). Susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to six antibiotics decreases as biofilm matures. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59(1), 59-65.
- Teles, R. P., & Teles, F. R. (2009). Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control? *Braz Oral Res*, 23 Suppl 1, 39-48.
- Toassi, R. F., & Petry, P. C. (2002). Motivation on plaque control and gingival bleeding in school children. *Rev Saude Publica*, 36(5), 634-637.
- West, N. X., & Joiner, A. (2014). Enamel mineral loss. *J Dent*, 42 Suppl 1, S2-11.

- Xavier, J., Picioreanu, C., Almeida, J., & Van Loosdrecht, M. (2003). Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Boletim de Biotecnologia*, 76, 2-13.
- Zaze, A. C., Dias, A. P., Amaral, J. G., Miyasaki, M. L., Sasaki, K. T., & Delbem, A. C. (2014). In situ evaluation of low-fluoride toothpastes associated to calcium glycerophosphate on enamel remineralization. *J Dent*, 42(12), 1621-1625.
- Zijnga, V., van Leeuwen, M. B., Degener, J. E., Abbas, F., Thurnheer, T., Gmur, R., & Harmsen, H. J. (2010). Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One*, 5(2), e9321.